



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI BİTKİ EKSTRELERİ İLE SAF FENOLİK BİLEŞİKLERİN
PROBİYOTİK VE PATOJEN MİKROORGANİZMALARIN
BİYOFİLM GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

ELİF KARPUZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi. PERVİN RAYAMAN

2020 - İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Elif KARPUZ



TEŞEKKÜR

Öncelikle danışmanlığımı üstlenen, tez çalışmam sırasında beni yönlendiren, hoşgörüsü ve sevgisi ile bana daima destek olan çok değerli Hocam Sayın Dr.Öğr. Üyesi Pervin RAYAMAN'a,

Yüksek lisans eğitimim sırasında ilgi, bilgi ve tecrübeleri ile desteğini esirgemeyen çok değerli Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER'e

Çalışmam sırasında değerli fikirleriyle her zaman yol gösteren ve desteğini hiç esirgemeyen çok değerli Hocam Sayın Dr.Öğr.Üyesi Erkan RAYAMAN'a,

Çalışmam sırasında desteğini ve ilgisini esirgemeyen Ecz. Esra DALKILIÇ'a ve Sayın Dr.Öğr.Üyesi Burçak GÜRBÜZ'e,

Laboratuvarını kullanımımıza açan Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof .Dr. Leyla BİTİŞ, bitkilerimi temin eden ve ekstrelerini hazırlayan çok değerli Hocam Dr.Öğr.Üyesi Turgut TAŞKIN ile bitkilerin teşhisini yapan Botanik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr.Öğr.Üyesi İsmail ŞENKARDEŞ'e

Laboratuvarlarını kullanımımıza açan Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr.Azize ŞENER ile ölçümlerde yardımcı olan Araş. Gör. Turgut ŞEKERLER'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca dostluklarını, gerektiğinde yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım arkadaşlarım Yıldız ARSLAN, Gülsüm KAYNAK, Elif KAYA, Elif MURCAK, Sinem SEZEN, Büşra BALCI ve Sena ARAL'a

Hayatımın her anında daima yanımda olan ve beni her konuda destekleyen çok kıymetli aileme sonsuz teşekkürler.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-C-YLP-170419-0151 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
RESİM LİSTESİ.....	xii
TABLO LİSTESİ.....	xiii
1.ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	8
4.1.Çalışmamızda Yer Alan Bitki Ekstreleri ve Saf Fenolik Bileşiklerinin Genel Özellikleri	8
4.1.1. <i>Thymus praecox</i> subsp. <i>skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> (TPS).....	8
4.1.2. <i>Satureja cuneifolia</i>	10
4.1.3. Rosmarinik asit	12
4.1.4. Malik asit	14
4.1.5. Tannik asit.....	16
4.1.6. Kaempferol	19
4.1.7. p-Kumarik asit	20
4.2. Çalışmamızda Yer Alan Patojen Mikroorganizmaların Genel Özellikleri.....	21
4.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un genel özellikleri	21
4.2.2. <i>Escherichia coli</i> 'nin genel özellikleri	22
4.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın genel özellikleri	24
4.2.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin genel özellikleri	25
4.2.5. <i>Salmonella typhimurium</i> 'un genel özellikleri.....	26
4.3.Probiyotik Tanımı.....	26
4.3.1. Probiyotik mikroorganizmaların genel özellikleri.....	27

4.3.3. Probiyotik / konakçı etkileşim mekanizmaları	33
4.4. Çalışmamızda Yer Alan Probiyotik Mikroorganizmaların Genel Özellikleri.	34
4.4.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> 'un genel özellikleri.....	34
4.4.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ' un genel özellikleri.....	37
4.4.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> ' un genel özellikleri.....	38
4.4.4. <i>Lactobacillus fermentum</i> ' un genel özellikleri	40
4.4.5. <i>Lactobacillus kefir</i> ' nin genel özellikleri.....	40
4.4.6. <i>Bifidobacterium spp.</i> ' nin genel özellikleri.....	41
4.4.7. <i>Bifidobacterium longum</i> ' un genel özellikleri	45
4.4.8. <i>Bifidobacterium bifidum</i> ' un genel özellikleri	46
4.4.9. <i>Enterococcus faecium</i> ' un genel özellikleri.....	47
4.4.10. <i>Streptococcus thermophilus</i> ' un genel özellikleri.....	49
4.5. Biyofilm.....	53
4.5.1. Biyofilmlerin bileşimi.....	54
4.5.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları.....	57
4.6. Endüstride Biyofilm Oluşumunun Dezavantajları	60
4.7. Endüstride Biyofilm Oluşumunun Avantajları.....	65
5. GEREÇ VE YÖNTEM	70
5.1. Gereç	70
5.1.1. Bitki ekstraktları ve saf fenolik bileşikler.....	70
5.1.2. Bitki ekstraktlarının hazırlanması	70
5.1.3. Mikroorganizmalar	71
5.1.4. Kimyasal maddeler ve ekipmanlar	72
5.2. Yöntem	74
5.2.1. Bakteri suşlarının aktifleştirilmesi	74
5. 2.2. Gram boyama.....	76

5.2.3. Antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi.....	77
5.2.3.1. Besiyerlerinin hazırlanması.....	77
5.2.3.1.2. Bitki ekstralarının antimikrobiyal aktivite deneyleri için hazırlanması.....	77
5.2.3.1.3. Disk difüzyon testi.....	78
5.2.3.1.4. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Değerinin Saptanması:	79
5.2.3.1.4.1. Mikrodülsiyon testi	81
5.2.4. Patojen mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi.....	84
5.2.5. Probiyotik mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi.....	85
5.2.6. Bitki ekstraları ve saf fenolik bileşiklerin biyofilm gelişimi üzerine etkisi	87
6. BULGULAR.....	89
6.1. Gram boyama testi sonuçları	89
6.2. Farklı bitki ekstraları ve saf fenolik bileşiklerin patojen ve probiyotik mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisinin değerlendirilmesi	90
6.2.1. Disk difüzyon deneyi	90
6.2.2. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) sonuçları	98
6.3. Patojen mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin değerlendirilmesi	102
6.4. Probiyotik mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin değerlendirilmesi	103
6.5. Bitki ekstraları ve saf fenolik bileşiklerin biyofilm gelişimi üzerine etkisi ..	105
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	1355
8. KAYNAKÇA	157
9.EKLER.....	197

10 .ÖZGEÇMİŞ.....	199
-------------------	-----



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ATCC: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu

CF: Kistik Fibrozis

CLSI: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü

CO₂: Karbondioksit

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

EPS: Ekzopolisakkarit

ECM :Ekstrasellüler matriks

FAO: Gıda ve Tarım Örgütü

GIT: Gastrointestinal Yol

GRAS: Generally Recognized As Safe (Genel olarak güvenilir-zararsız kabul edilen)

Kob: Koloni Oluşturan Birim

L: Litre

LPS : Lipopolisakkarit

µg: Mikrogram

mg: Miligram

MHA: Mueller Hinton Agar

MHB: Mueller Hinton Broth

MIK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

ml: Mililitre

MRSA: Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*

Mub: Mukus Bağlanma Proteinlerini

OD: Optik Dansite

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

RNA: Ribonükleik Asit

TPS: *Thymus praecox* subsp.*skorpilii* var. *skorpilii*

TSA: Tryptic Soy Agar

TSB: Tryptic Soy Broth

TSS: Toksik Şok Sendromu

FDA: Gıda ve İlaç İdaresi

WHO : Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Laktik asit bakterilerinin hücre duvarı ve membranı ile ilişkili proteinleri..	31
Şekil 2. <i>L. acidophilus</i> 'un hücre duvarı yapısı.	37
Şekil 3. Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyofilm geliştirme aşamaları.....	57
Şekil 4. Disk difüzyon metodu.....	79
Şekil 5 Mikrodilüsyon metodu şematik gösterimi	82
Şekil 6. Malik Asit ve Tannik Asitin <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	106
Şekil 7. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	106
Şekil 8. <i>Thymus praecox subsp.skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	107
Şekil 9. Malik Asit ve Tannik Asitin <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	108
Şekil 10. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	108
Şekil 11. <i>Thymus praecox subsp.skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	109
Şekil 12. Malik asit ve Tannik asitin <i>Klebsiella pneumoniae</i> klinik üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	110
Şekil 13 p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin <i>Klebsiella pneumoniae</i> klinik üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	110
Şekil 14. <i>Thymus praecox subsp.skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Klebsiella pneumoniae</i> klinik üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	111
Şekil 15. Malik asit ve Tannik asitin MRSA klinik üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	112
Şekil 16. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin MRSA klinik üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	112

Şekil 17. <i>Thymus praecox subsp.skorpilii var. skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın MRSA klinik üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	113
Şekil 18. Malik asit ve Tannik asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	114
Şekil 19. p-Kumarik asit ve rosmarinik asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	114
Şekil 20. <i>Thymus praecox subsp.skorpilii var. skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	115
Şekil 21. Malik asit ve Tannik asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	116
Şekil 22. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	116
Şekil 23. <i>Thymus praecox subsp.skorpilii var. skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Pseudomonas aeruginosa</i> klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	117
Şekil 24. Malik asit ve Tannik asitin <i>Escherichia coli</i> klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	118
Şekil 25. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin <i>Escherichia coli</i> klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	118
Şekil 26. <i>Thymus praecox subsp.skorpilii var. skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Escherichia coli</i> klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	119
Şekil 27. Malik asit ve Tannik asitin <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	120
Şekil 28. p-Kumarik asit ve rosmarinik asitin <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	120
Şekil 29. <i>Thymus praecox subsp.skorpilii var. skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	121
Şekil 30. Malik asit ve Tannik asitin <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	122

Şekil 31. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	122
Şekil 32. <i>Thymus praecox subsp.skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	123
Şekil 33. Malik asit ve Tannik asitin <i>Salmonella typhimurium</i> klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	124
Şekil 34. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin <i>Salmonella typhimurium</i> klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması.....	124
Şekil 35. <i>Thymus praecox subsp.skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Salmonella typhimurium</i> klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması	125
Şekil 36. Malik asit ve tannik asitin <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması.....	126
Şekil 37. Rosmarinik asit, <i>Thymus praecox subsp.skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> , <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması	126
Şekil 38. Tannik asit, p-Kumarik asit ve <i>Thymus praecox subsp.skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> 'nin <i>Bifidobacterium spp.</i> suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması	127
Şekil 39. Tannik asit, p-Kumarik asit ve <i>Thymus praecox subsp.skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> 'nin <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması	128
Şekil 40. Malik asit, Tannik asit, p-Kumarik asit ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması	129
Şekil 41. Malik asit,Tannik asit, p-Kumarik asit, Rosmarinik asit, <i>Thymus praecox subsp.skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Enterococcus faecium</i> suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması.....	130
Şekil 42. Malik asit,Tannik asit, p-Kumarik asit, Rosmarinik asit, <i>Thymus praecox subsp.skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması	131

Şekil 43. Tannik asitin <i>Lactobacillus kefir</i> suşu üzerine biyofilm oluşturma derecesi	132
Şekil 44. Malik asit,tannik asitin <i>Lactobacillus plantarum</i> suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması	133
Şekil 45. p-Kumarik asit,Rosmarinik asit, <i>Thymus praecox subsp.skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> , <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Lactobacillus plantarum</i> suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması	133
Şekil 46. Malik asit,Tannik asit, p-Kumarik asitin <i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması	134
Şekil 47. Rosmarinik asit, <i>Thymus praecox subsp.skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> , <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın <i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması	134

RESİM LİSTESİ

Resim 1. <i>Thymus praecox</i> subsp. <i>skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> 'nin genel görüntüsü.....	9
Resim 2. <i>Satureja cuneifolia</i> 'nın genel görüntüsü	11
Resim 3. Rosmarinik asitin kimyasal yapısı.....	12
Resim 4. Malik asitin kimyasal yapısı.....	15
Resim 5. Tannik asitin kimyasal yapısı	18
Resim 6. p-Kumarik asit kimyasal yapısı	21
Resim 7. MSA besiyerinde; <i>S. aureus</i> görüntüsü	22
Resim 8. EMB besiyerinde; <i>E.coli</i> görüntüsü	23
Resim 9. MHA besiyerinde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> görüntüsü	24
Resim 10. MacConkey agarda <i>Klebsiella pneumoniae</i> görüntüsü	25
Resim 11. SS agarda <i>S. typhimurium</i> görüntüsü.....	26
Resim 12. Diş plağı, göz kontakt lens ve boru iç yüzeyinde biyofilm yapısı.....	54
Resim 13. Biyofilm oluşturma renk skalası.....	86
Resim 14. <i>Satureja cuneifolia</i> ekstresinin klinik MRSA'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi	96
Resim 15. <i>Thymus praecox</i> subsp. <i>skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> ekstresinin klinik MRSA'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi.....	96
Resim 16. <i>Thymus praecox</i> subsp. <i>skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> ekstrelerinin <i>Lactobacillus plantarum</i> 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi	97
Resim 17. <i>Thymus praecox</i> subsp. <i>skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> ekstrelerinin <i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258'e karşı antimikrobiyal aktivitesi	97
Resim 18. Kristal viyole boyama yöntemi ile biyofilm oluşumunun temsili görüntüleri	103
Resim 19. Kristal viyole boyama yöntemi ile biyofilm oluşumunun temsili görüntüleri.....	105

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. En sık kullanılan probiyotik mikroorganizmaların listesi	28
Tablo 2. Probiyotik suşların seçim kriterleri	32
Tablo 3. Konakçı/ Mikroorganizma etkileşimlerinde rol oynayan hücre yüzey faktörleri.....	41
Tablo 4. İnsan deneylerinde etkinlik gösteren Bifidobacterium suşlarının etkileri...	44
Tablo 5. İnsan sağlığı için en yararları probiyotik mikroorganizmalar.....	51
Tablo 6. Biyofilmin kimyasal bileşimi.....	55
Tablo 7. Çalışmamızda kullanılan bitki kaynakları ,bitki ekstraktları ve saf fenolik bileşikler.....	70
Tablo 8. Çalışmamızda yer alan klinik ve standart suşlar	72
Tablo 9. Çalışmamızda yer alan probiyotik mikroorganizmalar.....	72
Tablo 10 . Çalışmamızda kullanılmış mikroorganizmaların inkübasyon süresi ve üreme ortamları	75
Tablo 11. Gram Boyama işleminin her adımında meydana gelen renk değişiklikleri	77
Tablo 12. Bitki ekstraktlarının ve saf fenolik bileşiklerin seri dilüsyon konsantrasyonları (MİK).....	83
Tablo 13. Biyofilm üretiminin yorumlanması.....	86
Tablo 14. Biyofilm Değişim Oranı.....	88
Tablo 15. Çalışmamızda yer alan mikroorganizmaların Gram boyama test sonuçları	89
Tablo 16. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Meropenemin Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) Standartlarına Göre Zon Çapı Yorumlama Standartları	91
Tablo 17. Malik asit, p-Kumarik asit ve tannik asitin patojen mikroorganizmalara karşı Disk Difüzyon Testi ile Belirlenmesi.....	92
Tablo 18. Malik asit, p-Kumarik asit ve tannik asitin probiyotik mikroorganizmalara karşı Disk Difüzyon Testi ile Belirlenmesi.....	93

Tablo 19. <i>Thymus praecox</i> subsp. <i>skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> (TPS), <i>Satureja cuneifolia</i> , Kaemferol ve Rosmarinik asit patojen mikroorganizmalara karşı Disk Difüyon Testi ile Belirlenmesi	94
Tablo 20. <i>Thymus praecox</i> subsp. <i>skorpilii</i> var. <i>skorpilii</i> (TPS), <i>Satureja cuneifolia</i> , Kaemferol ve Rosmarinik asit probiyotik mikroorganizmalara karşı Disk Difüyon Testi ile Belirlenmesi	95
Tablo 21. Meropenemin Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) Standartlarına Göre MİK Aralıkları	98
Tablo 22. Bitki ekstralarının ve saf fenolik bileşiklerin patojen mikroorganizmalar üzerine Minimum İnhibitör Konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi.....	99
Tablo 23. Bitki ekstralarının ve saf fenolik bileşiklerin probiyotik mikroorganizmalar üzerine Minimum İnhibitör Konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi	100
Tablo 24. Meropenemin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	101
Tablo 25. Patojen mikroorganizmaların 24 saatlik inkübasyon sonunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri.....	102
Tablo 26. Probiyotik mikroorganizmaların 48 saat ile 72 saat inkübasyon sonunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri.....	104

1.ÖZET

Bazı Bitki Ekstreleri ile Saf Fenolik Bileşiklerin Probiyotik ve Patojen Mikroorganizmaların Biyofilm Gelişimi Üzerine Etkisi

Öğrencinin Adı: Elif KARPUZ

Danışman Adı: Dr. Öğr. Üyesi Pervin RAYAMAN

Anabilim Dalı: Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklere dirençli bakterilerin artmasıyla beraber, bitki ekstraları, saf fenolik bileşikler ve probiyotiklere olan ilgi artmıştır. Dolayısıyla çalışmamızda, bitki ekstraları ve saf fenolik bileşiklerin, probiyotikler ve patojen mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktivitesi ile bu mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasitesi üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 5 adet klinik patojen , 5 adet standart bakteri suşu ile 5adet standart probiyotik ve preparatlardan izole edilen 5 adet probiyotik olmak üzere toplam 20 adet mikroorganizma kullanılmıştır. Mikroorganizmaların antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. Suşların biyofilm oluşturma kapasitesi, kristal viyole boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Bitki ekstraları ve saf fenolik bileşiklerin biyofilm gelişimini engelleme (antibiyofilm) ve biyofilm gelişimini arttırma (stimüle) yüzdeleri, kristal viyole bağlanma metodu ile araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda yer alan bitkisel ajanlardan *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*, *Satureja cuneifolia*, rosmarinik asit, tannik asit, malik asit ve p-Kumarik asitin antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. *Satureja cuneifolia*'nın standart mikroorganizmalardan *Staphylococcus aureus* ATCC 'a karşı (58,11 mm/zon; 0,08 mg/ml); probiyotik mikroorganizmalardan *Streptococcus thermophilus*'a karşı (33,77 mm/zon; 0.65 mg/ml) en yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Çalışmamızda mikroorganizmaların tümü zayıf, orta ve güçlü olmak üzere biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Bitkisel ajanların, standart mikroorganizmalardan *Staphylococcus aureus* 'a karşı en yüksek antibiyofilm aktivite gösterdiği, saf fenolik bileşiklerden tannik asitin, probiyotik mikroorganizmalardan *Lactobactobacillus fermentum* ATCC 14931'un biyofilm gelişimini 10 kat arttırdığı belirlenmiştir.

Sonuçlar: Bitkisel ajanlar biyofilm oluşturan patojen mikroorganizmaların neden enfeksiyonların kontrolüne katkı sağlayabilir. Probiyotik mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasitesi ve biyofilm gelişimi arttırılan bu ajanların işlevsel gıdaların üretimi, verimi ve kalitesi için yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Probiyotik mikroorganizma, patojen mikroorganizma, bitki ekstraları, ekzopolisakkarit, biyofilm

2. SUMMARY

The Effect of Some Plant Extracts and Pure Phenolic Compounds on Biofilm Development of Probiotic and Pathogenic Microorganisms

Student's Name: Elif KARPUZ

Name of Supervisor: Assist. Prof. Dr. Pervin RAYAMAN

Department: Pharmaceutical Microbiology

Aim: Since the increase of antibiotic resistant bacteria used in the treatment of infectious diseases, the interest on plant extracts, pure phenolic compounds and probiotics has increased. Accordingly, it was aimed to investigate the effects of plant extracts and pure phenolic compounds on probiotics and pathogenic microorganisms with their antimicrobial activity for the investigation of biofilms of these microorganisms.

Materials and Methods: In our study 5 clinical pathogens, 5 standard bacterial strains and 5 standard probiotics and 5 probiotics isolated from preparations were used among a total of 20 microorganisms. Disc diffusion and microdilution methods were used to determine the antibacterial activities of microorganisms. Biofilm forming capacity of strains was determined by crystal violet staining method. Percentages of herbal agents to prevent and increase biofilm development were determined by crystal violet binding method.

Results: *Thymus praecox subsp. skorpilii var. skorpilii*, *Satureja cuneifolia*, rosmarinic acid, malic acid and p-Coumaric acid showed antibacterial activity. It was determined that *Satureja cuneifolia* showed the highest antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (58,11 mm/zone; 0,08 mg/ml) and *Streptococcus thermophilus* (33,77mm/zone;0,65 mg/ml) among the probiotic microorganisms. All of the microorganisms formed biofilms. Herbal agents had the highest antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* among the standard microorganisms. It has been determined that among the pure phenolic compounds tannic acid increased the biofilm development of *Lactobactobacillus fermentum* ATCC 14931 10 times in hold.

Conclusion: Herbal agents can provide an alternative to control of biofilm-related infections caused by patogenic microorganisms. Additionally, in our opinion probiotic microorganisms can be a tool for the production, efficiency and quality of functional foods by increasing biofilm development capacity and biofilm development.

Keywords: Probiotic microorganism, pathogenic microorganism, plant extracts, exopolisaccharides, biofilm

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde antibiyotiklerin yanlış ve uygun olmayan şekillerde kullanımı bir veya daha fazla antibiyotik direnç geni taşıyan, çoklu antibiyotiğe karşı dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Çoklu ilaç direncine neden olan bakteriyel enfeksiyonların tedavi süresini uzattığı, mortalite oranını ve maliyeti arttırdığı bilinmektedir. Çoklu ilaç direncine neden olan bakteriyel enfeksiyonların başında stafilokoklar ve streptokokların neden olduğu solunum yolu enfeksiyonları, ve birçok antibiyotiğe direnç kazanan *Pseudomonas spp.*'ın neden olduğu üriner sistem enfeksiyonları örnek olarak verilebilmektedir (Khan ve ark., 2009; Mann, 2012; Topal ve ark., 2015; Marasini ve ark., 2015; Barancheshme ve ark., 2019).

Yapılan çalışmalarda nozokomiyal enfeksiyonların %65'inin biyofilm oluşumu ile ilişkilendirilip, kronik bakteriyel enfeksiyonların %80'inden fazlasında biyofilm yapısının sorumlu olduğu bildirilmiştir (Beğendik, 2003; Moura ve ark., 2017; Eraç ve ark., 2018).

Bakteriyel biyofilmlerin tıp, sanayi ve endüstriyel ortamlarda sorunlara neden olduğu, doğal ve yapay yaşam alanlarında gelişerek insan sağlığı için risklere ve ekonomik kayıplara sebebiyet verdiği bildirilmiştir. Bu nedenle araştırmalar, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde biyofilmlerin neden olduğu zararları en aza indirmek amacıyla patojen mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasitesini erken evrede belirlemekte ve alternatif antibiyofilm ajanlarının tanımlanması için çalışmalar devam etmektedir (Moura ve ark., 2017; Eraç ve ark., 2018).

Günümüzde tıbbi ve aromatik bitkilerin ilaç sanayisi için kullanımında büyük artış görülmektedir. Bitkiler potansiyel tedavilerde doğal kaynaklar oluşturmakta olup uzun bir süredir, insan ve hayvan sağlığını korumak için değerli doğal ürünler olarak kullanılmaktadır. Bitki kaynaklı moleküller, farklı yüzeylerde bakteri kolonizasyonu ve biyofilm gelişimini azaltmak için potansiyel uygulamaları açısından değerlendirilmektedir. (Cowan, 1999; Yoğunlu, 2011; Beolet ve ark., 2016; Moura ve ark., 2017).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan bir araştırmaya göre yeryüzünde tahmini olarak 20 000 çeşit bitki türünün tıbbi amaçla kullanıldığı tespit edilmiştir (Yoğunlu, 2011). Türkiye florası içerdiği tür sayısı ve endemik bitkiler açısından dünyada önemli bir gen merkezi konumunda olup ülkemizde 9000 civarında endemik bitki bulunduğu bilinmektedir (Nalbantbaş ve Gölcü, 2009).

Bitkilerin patojen mikroorganizmalar üzerine öldürücü etkileri 1926 yılından beri yapılan deneysel çalışmalar ile gösterilmiş olup insan sağlığına zararlı olmayan ve mikroorganizmalar üzerine etki edecek yeni ilaçların keşfedilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Kırbağ ve ark. 2005; Polat, 2010).

Doğal olarak yetişen bu şifalı bitkilere karşı ilginin fazla olmasının birçok nedeni bulunmaktadır. Bunlardan biri, sentetik kökenli ilaçların insan vücudunda istenmeyen ve beklenmedik bazı yan etkiler oluşturmalarıdır. Diğer bir önemli neden ise bitki droglarının birden fazla etkiye sahip olurken sentetik ilaçlar genellikle tek bir etkiye sahiptir (Duman Aydın, 2008; Chandra ve ark.,2017).

Buna ilaveten çalışmamızda yer alan bitki eskrelerinden *Thymus praecox subsp. skorpilii* var. *skorpilii* (TPS) geleneksel bir bitkisel ilaç olup, gastrointestinal sistemi rahatlatmak, franjit vb rahatsızlıkları gidermek amacıyla kullanılmaktadır. (Çam ve ark.,2017).

Çalışmamızda yer alan bitki eskrelerinden *Satureja cuneifolia* bir kekik türü olup baharat ve bitki çayı olarak kullanımı ile tanınmış aromatik bir bitkidir. Buna ilaveten *Satureja cuneifolia*'nın antioksidan (Eminağaoğlu ve ark.,2007), antifungal (Skocibusić M ve Bezić N. 2004) ve antiparaziter (Malatyali ve ark.,2012) etki gösterdiği bildirilmiştir.

Çalışmamızda yer alan rosmarinik asit birçok bitkide (biberiye, perilla, adaçayı, nane, fesleğen, limon otu vb) bulunan bir polifenol olup, kaffeik asit ve 3,4 dihidroksifennillaktik asit esteridir. İn-vitro koşullarda yapılan çalışmalarda rosmarinik asitin anti-HIV-1, karaciğer koruyucu, antienflamatuvar, antitümör,

antidepresan, antianjiojenik, ve antioksidan dahil olmak üzere birçok farmakolojik aktiviteye sahip doğal bir flavonoid olduğu bildirilmiştir (Gökçen,2017; Veras ve ark., 2019; Iwona ve ark.,2019).

Çalışmamızda yer alan malik asit dört karbonlu dikarboksilik asit ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde bir ara madde olup doğal olarak birçok meyve ve sebze bulunmaktadır. Malik asitin; alüminyum ve kurşun gibi metallere bağlanarak bu metallerin toksik etkilerinin azaltıldığı, ağız sağlığının korunduğu, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Raybaudi-Massilia, 2009; Chi ve ark.,2016; Allı, 2018).

Buna ilaveten çalışmamızda yer alan flavonoid yapıda olan tannik asitin diğer flavonoidler gibi oksidatif hasarı önleyebildiği, serbest radikalleri süpürücü antioksidan özellik gösterebildiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Fedeli ve ark., 2004).

Çalışmamızda yer alan kaempferol birçok bitkide bulunan flavonoid bir bileşik olup (Calderón-Montaña ve ark., 2011) bazı mekanizmaları (nükleik asit sentezi, enerji metabolizması vb.) inhibe ederek antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Hendra et al., 2011).

Son olarak çalışmamızda yer alan p-Kumarik asit günümüzün en önemli sorunları arasında yer alan stresin, tümör hücrelerini öldürmede ve mide kanseri ile mücadelede oldukça etkili olduğu saptanmıştır (Abdel-Wahab ve ark., 2003; Sousa ve ark., 2004; Koç, 2014).

Antibiyotiklerin ekolojik zararları, mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç sebebi ve yüksek maliyetleri yeni arayışları ortaya çıkarmaktadır. Bu yeni arayışlardan biri probiyotiklerin kullanımıdır. Probiyotik bakteriler insan ve hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren ve tüketilmeleri sonucunda gastrointestinal sistemde, ağızda, üst solunum yollarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığında iyileşmeye yardımcı olan

mikroorganizmalardır. Bu bakteriler özellikle besin maddeleri için zararlı mikroorganizmalar ile rekabete girerek patojen istilası ve kolonizasyonu önleyerek gastrointestinal sistemdeki faaliyetleri ile konakçının sağlığını olumlu yönde etkilemektedir (Başoğlu, 2014; Ouwehand ve ark.,2016; Kıvanç,2018; Abatenh ve ark.,2018).

Probiyotiklerin gıdalarda kullanımında hayvansal kaynaklı gıdalar, yoğurt, fermente süt ve peynir vb. probiyotik mikroorganizmaların gelişimi için uygun bir gıda matrisi oluşturmaktadır. Özellikle fermente süt ürünleri probiyotik taşıyıcı özellikte olup meyve, sebze bazlı veya hububat ürünler ile kapsül, tablet veya granül formunda farmasötik ürün olarak yer almaktadır. Sebzeler ve meyveler içerdikleri, diyet lifleri, karbonhidratlar, vitaminler, mineraller, fitokimyasallar, ve polifenoller bakımından zengin oldukları için sağlıklı gıdalar olarak isimlendirilmektedirler. Ayrıca bitkisel kaynaklı gıdalar süt alerjisi içermemelerinden dolayı hayvansal kaynaklı gıdalardan daha fazla avantaja sahiptirler (Luckow ve Delahunty, 2004; Doyle ve ark.,2013; Shori, 2016; Bansal ve ark., 2016; Patel, 2017).

Bilindiği gibi planktonik hücreler olumsuz koşullardan daha kolay etkilenmektedir. Bu durum göz önüne alınarak özellikle probiyotik mikroorganizmaların daha dayanıklı hale gelebilmeleri açısından biyofilm oluşturmaları gıda sanayisinde bu mikroorganizmaların tercih edilmesine neden olmuştur. Probiyotik mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak patojen bakterilerin kolonizasyonunu engeller ve gastrointestinal sistem boyunca uzun süre canlı kalmalarını sağlayan bir yapı oluşturmaktadır. Dolayısıyla probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimini destekleyen yeni organik ürünlere de ihtiyaç duyulmaktadır (Jalilsood ve ark. 2015; Stanbro ve ark.,2016; Salas-Jara ve ark. 2016).

Çalışmamızda yer alan probiyotik ürün ve preparatlardan izole edilen 5 adet probiyotik mikroorganizma, 5 adet standart probiyotik mikroorganizma ile 5 adet klinik ve 5 adet standart patojen mikroorganizmanın uygun konsantrasyonlarda bitki ekstraktları ve saf fenolik bileşiklerin disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleriyle antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Probiyotik ve patojen mikroorganizmaların

biyofilm oluşturabilme yetenekleri kantitatif sonuçlar veren “Mikro plaka (96 kuyucuklu plaka) yöntemi” ile belirlenerek bazı bitki ekstrelerinin ve saf fenolik bileşiklerin varlığında biyofilm oluşturan probiyotik ve patojen mikroorganizmaların bu bileşiklerden olumlu/olumsuz özellikleri belirlenmiş ve elde ettiğimiz bulgular ile desteklenmiş olup probiyotik preparatların geliştirilerek daha etkin hale getirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca alışmamızda yer alan bitki ekstreleri ve saf fenolik bileşiklerin patojen mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite göstermesi ile enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde yeni stratejiler oluşturularak antibiyotik kullanımının azaltılması ve tamamlayıcı doğal kaynaklı ürünlerin elde edilmesi, literatür çalışmalarına katkıda bulunması ve bu doğrultuda yürütülecek çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1.Çalışmamızda Yer Alan Bitki Ekstreleri ve Saf Fenolik Bileşiklerinin Genel Özellikleri

4.1.1. *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii* (TPS)

Son yıllarda doğal ürünler ve tıbbi bitkilerle tedaviye ilgi artmakta ve bu amaçla çok sayıda ürün piyasaya sürülmektedir. Dünyadaki en büyük bitkisel ailelerden biri olan Lamiaceae familyası yaklaşık olarak 236 cins ve 6900-7200 tür ile zengin bir bitki çeşitliliğini barındırmakta olup ülkemizde 38 cins 400 türü içermekte ve bunların 240'ı endemik çok yıllık bir bitkilerdir (Tzima ve ark.,2018).

Lamiaceae familyası endemik bitki bakımından oldukça zengin olup en iyi bilinen cinsleri *Thymus*, *Satureja*, *Salvia*, *Teucrium*, *Stachys*, *Marrubium*, *Origanum*, *Satureja*, *Ajuga* ve *Lamium*dur. Lamiaceae familyasına ait *Thymus* cinsi tıbbi ve ekonomik önemi olan bitkiler sınıfındandır. *Thymus* (Kekik) cinsi Güney Akdeniz ve Asya'da yayılış gösteren genel olarak yemeklere tat ve koku vermesiyle bilinen, kendine has kokuya sahip, odunsu, çok dallı, görüntüsüyle küçük çalimsı, çok yıllık bir bitkidir. Özellikle mayıs ve eylül aylarında çiçeklenmektedir (Kocabaş ve ark.,2001; Özkan,2007; Hossain ve ark.,2010; (Moradi ve ark.,2017).

Kekik öncelikle, dezenfekte edici, alkollü ekstratı balgam söktürücü, kramp çözücü, koroner hastalıkların tedavisinde, akciğer ve bronşlarda oluşan enfeksiyonların tedavisinde, mide ve bağırsaklar, baş ve diş ağrılarında, cilt hastalıkları tedavisinde, böcek sokmalarında, romatizmal hastalıkların tedavisinde vb birçok (parfümeri ve kozmetik sanayi) kullanım alanlarına sahiptir (Fakılı ve ark.,2010; Çetin ve Göçmen.,2013; Dauqan ve ark.,2017).

Jamroz ve ark., (2005) kekik (karvakrol), tarçın (cinnamaldeyde) ve karabiber (capsaicin)'den oluşan bitkisel ekstraktının etlik piliçlerde canlı ağırlık üzerine belirgin bir etkisi gözlenmezken, yemden yararlanmanın %2 ile %4,2 arasında arttığı, bağırsaklarda *E.coli*, *Clostridium perfringes* ve mantar sayısını azaldığı, *Lactobacillus spp.* sayısını arttığını, pankreas ve bağırsak duvarındaki lipaz aktivitesini yükselttiğini bildirmişlerdir.



Resim 1. *Thymus praecox subsp. skorpilii var. skorpilii*'nin genel görüntüsü (Uçman,2017).

https://www.turkiyebitkileri.com/tr/foto%C4%9Fraf-galerisi/view_album/4137.html

Doğu Karadeniz Bölgesinde yaygın olarak yetişen Labiatae familyasına ait olan *Thymus praecox subsp. skorpilii var. skorpilii* (TPS) bitkisel çay, baharat ve geleneksel tedavi amaçlı kullanılan bir kekik türü olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda yer alan *Thymus praecox subsp. skorpilii var. skorpilii* (TPS) uzun, odunsu, sürünen dallara sahip, çiçek sapları sıra halinde konumlanmış, genellikle leylak veya mor renginde, nadiren beyazımsı bir renge sahip bir bitki türüdür. *Thymus praecox subsp. skorpilii var. skorpilii* Eskişehir ilinde yaygın olarak kullanılan boğaz yumuşatmak, nefes darlığının tedavisi ile antispazmolitik etkisiyle beraber birçok faydası bulunan ve çay formunda tüketilen bir bitkidir (Tepe ve ark.,2005; Şekeroğlu ve ark.,2007; Uçman,2017; Cam ve ark.,2019).

Türkiye'nin Amasya ve Giresun illerinde yaygın olarak diyabet tedavisinde kullanıldığı saptanmıştır (Tepe ve ark.,2005; Şekeroğlu ve ark.,2007; Cam ve ark.,2019).

Taşkın ve ark., (2018) *Thymus praecox subsp. skorpilii var. skorpilii* (TPS) in vitro ve in vivo koşullarda antioksidan, antikolinesteraz, antimikrobiyal, anti-üreaz ve in vivo anti-inflamatuar aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar *Thymus praecox subsp. skorpilii var. skorpilii*'nin özellikle *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca *Thymus praecox subsp. skorpilii var. skorpilii* in vivo koşullarda anti-enflamatuar aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

4.1.2. *Satureja cuneifolia*

Türkiye'de *Satureja (Labiatae)* cinsine ait 15 tür bulunmakta ve özellikle Akdeniz bölgesinde yetişen bir kekik cinsidir (Davis ve ark.,1982; Öke ve ark.,2009). *Satureja* cinsi içerdiği esansiyel yağlar, fenolik bileşikler, tanenler, steroller, asitler, sakız, müsilaj ve kateşoller nedeniyle tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. *Satureja* cinsinin birçok üyesi aromatik ve tıbbi özelliklere sahiptir. Yapraklar, çiçekler ve saplar hoş aroması nedeniyle bitkisel çay olartak kullanılmaktadır. Ayrıca bu cinsin yapısında yer alan timol ve karvakrol sayesinde gıda,ilaç ve kozmetik sektöründe, geleneksel tıpta kramplarda, kas ağrılarında, bulantı, hazımsızlık, ishal ve bulaşıcı hastalıklar gibi çeşitli rahatsızlıklarda tedavi amacıyla kullanıldığı bildirilmiştir (Azaz (a) ve ark.,2004; Eminagaoglu ve ark.,2007; Momtaz ve ark.,2010).



Resim 2. *Satureja cuneifolia*'nın genel görüntüsü

(<http://dogalhayat.org/property/satureja-cuneifolia-kaya-kekigi-ibre-kekik-sanci-yiyen/>,

Erişim tarihi: 11 Mart 2020).

Çalışmamızda yer alan *Satureja cuneifolia* bitkisi ülkemizde farklı isimler ile tanımlanmakta olup bunlardan bir kaçı yayla kekiği, sivri kekik, dağ kekiği, kılıç kekik, şeytan kekik ve arı kekiği gibi yöresel isimlerdir. *S.cuneifolia* özellikle Manisa, İzmir, Konya ve Antalyada yetişmekte olup her bahar ayında yeni filizler veren sarıdan mora renkli çiçekler açan, çok yıllık yarı çalimsı formda, 12-30 cm boyunda, güneşli, kurak, taşlık ve kayalık alanlarda konumlanmış bir kekik türüdür. Başta çay olmak üzere, şeker, tansiyon ve kolesterol düşürücü gibi birçok faydaları ile ilgi görmektedir. *S.cuneifolia* türünün uçucu yağ bileşenlerinde; timol (% 42,5-45,2), karvakrol (% 8,5 - % 32,6), p-simen (% 19,4 - % 22,2), gamaterpinen (% 15,1), mirsen (% 5,5) ve karyofilen(%3,3) ana bileşikleri bulunmaktadır (Davis ve ark.,1982; Tümen ve ark.,2003, Mirjana ve ark.,2004; Satıl ve ark.,2007; Yaylı ve ark.,2014; Tepe ve ark.,2016).

Öke ve ark., (2009) *S.cuneifolia* türünün esansiyal yağlarının antibakteriyel aktiviteleri araştırılmış ve bu araştırmanın sonucunda bu yağların iyi b antioksidan ve antibakteriyel aktivite gösterdiğini saptanmışlardır.

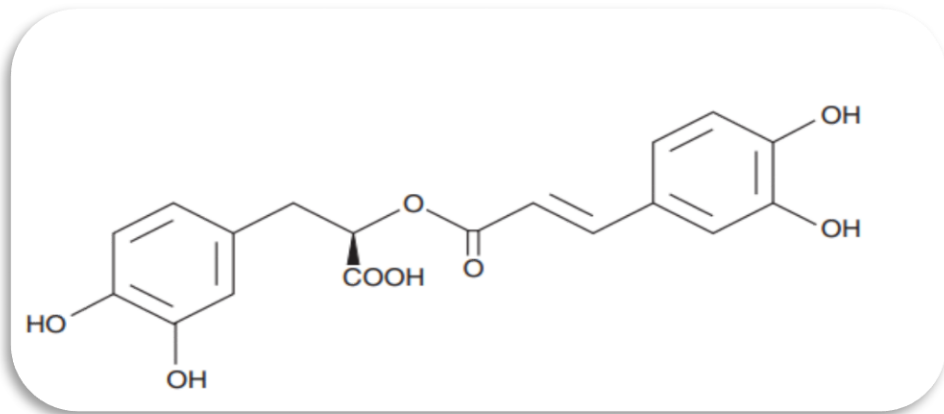
Buna ilaveten Altundağ ve ark., (2010) *S.cuneifolia*'nın doğada bol miktarda bulunmakta olup gıda olarak kullanılması nedeniyle insan ve çevre sağlığı açısından hiçbir risk oluşturmayacağı, patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliğinin olduğunu göstermişlerdir.

Al Hafi ve ark., (2017) *S.cuneifolia*'nın uçucu yağının antibakteriyel (*E. coli* ATCC 8739 (0,4 mg/ml), *P. aeruginosa* ATCC 9027 (0,2 mg/ml) , *S. aureus* ATCC BAA-1026 (0,2 mg/ml)) aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır.*S.cuneifolia*'nın antimikrobiyal aktivite gösterirken plazma zarının lipit fraksiyonunun yapısal ve fonksiyonel özelliklerini etkileyerek özellikle hücre membranını tahrip edip solunum enzimlerini ve patojen mikroorganizmaların oksidatif fosforilasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

4.1.3. Rosmarinik asit

Rosmarinus officinalis ve birçok bitkinin yapısında antimikrobiyal etkinlik gösteren polifenoller bulunmaktadır. Bunlar; fenolik asitler (rosmarinik asit, karnosik asit, karnosol ve luteolin), triterpen türevi bileşikler ve flavonoidlerdir (Bai ve ark. 2010). Bu moleküller, lipid peroksidasyonu azaltan, reaktif oksijen türlerinin üretimini inhibe eden, inflamasyonu baskılayan ve flavonoidler, fenoller, uçucu yağ ve terpenoidleri içeren güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler göstermektedir (Abenavoli ve ark.,2017; Neves ve ark.,2018).

Polifenolik bileşikler çeşitli hastalıklara (tümörler dahil) ve sağlık risklerine karşı hayati öneme sahip önemli bileşenleri içinde barındırmaktadır (Bulgakov ve ark.,2012; Karthikkumar ve ark.,2012). Rosmarinik asit de en önemli polifenollerden biri olarak kabul edilmekte olup antioksidan (Shanlou ve ark.,2005; Sui, ve ark.,2012), anti-inflamatuar (Osakabe ve ark.,2004), antimutajenik (Furtado ve ark.,2008), antianjiyonik (Huang ve ark.,2006), antiapoptotik (Kim ve ark.,2005), antifibrotik (Li ve ark.,2010) aktivite gösteriği saptanmıştır. Ayrıca rosmarinik asitin antiviral, anti-tümör (Shetty ve Lin, 2007, Romano ve ark., 2009; Boonyarikpunchai ve ark, 2014), atopik dermatitin azaltılması (Lee ve ark.,2008) ve Alzheimer hastalığının önlenmesi (Hamaguchi ve ark.,2009) gibi bir dizi biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Zebra balıklarının önemli bir patojenik bakterisi olan *Aeromonas hydrophila*'nın 750 ug/ ml konsantrasyonunda biyofilm oluşumunu in vitro olarak inhibe ettiği saptanmıştır (Rama ve ark.,2017).



Resim 3. Rosmarinik asitin kimyasal yapısı

(<https://www.biomol.com/products/chemicals/biochemicals/rosmarinic-acid-cay70900-5>, Erişim tarihi: 12 şubat 2020).

Akhtar ve ark., (2017) rosmarinik asitin klinik *P. aeruginosa* (13 mm/zon), *S. aureus* (12 mm/zon), ve *E. coli* (10 mm/zon) üzerine antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Teixeira ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus johnsonii* (N6.2)'nin doğal antioksidan ve antienflamatuvar molekül olan rosmarinik asit (RA) ile birlikte etkilerini araştırmış ve rosmarinik asitin *L. johnsonii* (N6.2) ile beraber inflamasyonu yönlendiren önemli konakçı metabolitlerinin biyosentezini modüle edebildiğini saptamışlardır.

Bir başka çalışmada ise Ekambaram ve ark., (2016) rosmarinik asitin disk difüzyon yöntemi ve minimum inhibitör konsantrasyonlarını araştırmışlardır. Araştırmacılar rosmarinik asitin *S. aureus* ATCC 25923 (disk difüzyon zon; 12 mm/zon: MIC; 0,8 mg/ml)'a ve MRSA klinik izolat (disk difüzyon zon; 11 mm/zon: MIC; 10 mg/ml)' a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirilmiştir. Çalışma sonucunda Ekambaram ve ark., (2016) rosmarinik asitin yüksek MIC değeri, bakteri hücre duvarına zayıf nüfuz etme kabiliyeti nedeniyle olabileceğini önesürmüşlerdir.

Adamczak ve ark., (2019) rosmarinik asitin minimum inhibitör konsantrasyonlarını araştırmış, *S. aureus* (MIC; 1 mg/ml)'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna ilaveten Slobodníková ve ark., (2013) rosmarinik asitin *Staphylococcus aureus* biyofilm gelişiminin erken aşamalarında baskıladığını bildirmişlerdir.

Nunes ve ark., (2017) *Lavandula stoechas* spp. *Luisieri* bitkisinde bol miktarda bulunan rosmarinik asitin minimum inhibitör konsantrasyonlarını araştırmış, *S. aureus* (MIC; 9 mg/ml)'a, *E.coli* (MIC; 7 mg/ml)'ye, karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini göstermişlerdir.

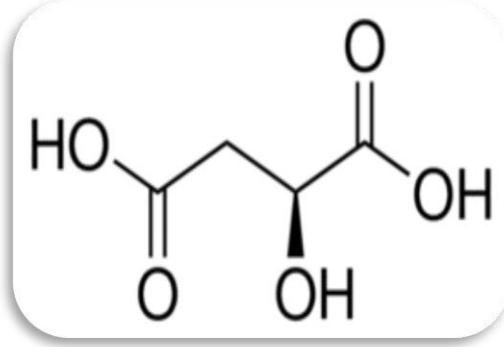
4.1.4. Malik asit

Malik asit sert ve yumuşak çekirdekli meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunan bir çeşit meyve asidi olup özellikle jölelerde, meyveli pastalarda, meyve sularının yapım aşamasında kullanılmaktadır. Çalışmamızda yer alan L-malik asit formu elmada, kayısıda, muzda, kirazda, üzümde, portakal kabuğunda, brokolide, armutta, erikte, havuçta, patatesten, taze fasulye gibi sebze ve meyvelerde bulunan bir organik asit olup, beyaz kristal yapıda olan erime noktası yaklaşık 125 °C’de, suda iyi çözünmesi itibarıyla kullanım alanı oldukça yaygın, hidroksisüksinik asit esteridir. Yeşil elmanın ekşi tadını vermesini sağlayan organik asit malik asittir. Malik asit miktarı ne kadar azalırse meyvenin olgunlaşma hızında ters orantılı bir şekilde artmaktadır. Tat olarak şarabı andırmakta olup, gıda sanayisinde lezzet verici, gazoz ve meşrubat çeşitlerinde ise asit düzenleyici olarak besinlere ilave edilerek tüketilmektedir. Ayrıca ticari öneme sahip malik asit sirkeli ve tuzlu cipslerin yapımında ana tatlandırıcı olarak kullanılan bileşenler arasında yer almaktadır (Kirk ve ark 1981; Bravo-Ferrada ve ark.,2016; Olgun ve ark.,2016).

Malik asit, genellikle Gıda ve İlaç İdaresi (USFDA 2006) tarafından güvenli olarak kabul edilen meyve ürünlerine mükemmel duyu özellik verme potansiyeline sahip, nispeten yeni ve gelişmekte olan bir asit koruyucudur. Özellikle şuruplara malik asit eklenerek acı tadın giderilmesi sağlanmaktadır (Fernandesce ark.,2001; Raybaudi-Massilia ve ark., 2009).Malik asit, asetik asit, sitrik asit gibi organik asitler antimikrobiyal aktivite gösterirken; mikroorganizmaların hücre zarı üzerinde gözenekler oluşturarak asit moleküllerinin bakteri hücrelerine difüze olmasını kolaylaştırırlar. Ayrıca mikroorganizmaların hücre içi pH’sını düşürüp, hücre zarı geçirgenliğini değiştirirerek, substrat transportunu bozarak ve proton hareket kuvvetini azaltarak etki göstermektedirler (Stratforde ve ark.,2003; swaranandam ve ark.,2004).

İki stereo izomerik formu (L- ve D-enantiomerleri) bulunan L-malik asit formu metal temizlenmesi, tekstil sanayii, kağıt endüstrisi, gıda, içecek, kimyasal, tıbbi endüstri ayrıca kozmetik alanında özellikle güneş koruyucularına ilave edilerek UV’ ye bağlı kronik güneş hasarların azaltılması, foto-yaşlanma izlerinin giderilmesinde, akne, yara

izleri, melazma, hiperpigmentasyon, pürüzlülük, yaşlılık lekeleri, bazı deri kanserlerini ve kanser öncülerinin oluşumunu engelleyerek fayda sağlamaktadır (Olgun ve ark.,2016; Lee ve ark.,2019).



Resim 4. Malik asitin kimyasal yapısı

https://en.wikipedia.org/wiki/Malic_acid (Erişim tarihi: 11 Şubat 2020).

Pintado ve ark., (2010) %3'lük malik asitin *L. monocytogenes* CP6 (2,5 mm/zon), *Pseudomonas aeruginosa* P6 (0,5 mm/zon) suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kim ve ark (2009) malik asidin *E. coli O157:H7*'ye (4,2 mg/ ml) karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Allı (2018) ise sumak ekşisinden doğal olarak elde edilen malik asit kalsiyum kompleksinin yapısal karakterizasyonu, retina hücresinde hidrojen peroksit ile oluşturulan hücre hasarında koruyucu rolünü ve antimikrobiyal etkisini araştırmıştır. Çalışma sonucunda araştırmacı malik asitin en büyük inhibisyon zonunun *S. aureus* suşuna karşı olup 18 mm zon ve *E. coli* bakteri suşuna karşı ise 19 mm zon elde edildiğini bildirmiştir.

Shamsuzzoha ve ark., (2015) malik asitin bakır 100 µg Cu (II) ve 100 µg kadmiyum Cd (II) metal komplekslerinin *Klebsiella spp.* (20mm, 30mm) suşuna karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini saptamışlardır .

Singla ve ark., (2014) %2'lik malik asitin 2 ppm ozon ile birlikte kullanımının *Salmonella typhimurium*'un gıda temaslı plastik ve PVC (polivinil karbon) yüzeylerde oluşturduğu biyofilmlerin kontrolü için etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Kökümer ve ark., (2016) %10 (w/v) malik asitin *S. aureus*'un biyofilm oluşumunu en fazla %47 oranında önlediği, oluşan biyofilmin de en fazla %85'ini ortadan kaldırıldığı tespit edilmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca malik asitin *S. aureus*'un biyofilm oluşumunu klor uygulamasından daha etkin bir şekilde engellediğini saptamışlardır.

4.1.5. Tannik asit

Tanen" adı Fransızca'daki "tanin" kelimesinden türetilmiş olup bir dizi doğal polifenol için kullanılmaktadır. Tanenler belirli çevresel koşullar altında hidroksil ve karboksil gibi diğer uygun gruplar içeren, yüksek molekül ağırlıklı (500-3000 Da) sahip, protein ve diğer makromoleküllerle etkileşerek güçlü kompleksler oluşturan fenolik bileşiklerdir (Bate-Smith, 1962; Horvath, 1981; Khanbabaee ve ark.,2001).

Tanenler ve hidrolize olabilen tanenlerden tannik asit çeşidi özellikle antimikrobiyal aktivite gösterirken; hücre duvarında yer alan peptitoglikan tabakasına doğrudan bağlanabilir ve antibakteriyel fonksiyona ulaşmak için bütünlüğüne müdahale ederek biyofilm oluşumunu engellemektedir. Bununla birlikte, tanik asidin altta yatan etki mekanizmalarını tanımlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Substrat ve enzimlerin kompleks oluşturması sonucu mikrobiyal enzimleri inhibe etmesi ayrıca mikroorganizmaların hücre membranlarında toksik etki yaratarak ve metal iyonlarına bağlanarak toksik etkiyi arttırıp inhibe etme esasına dayanmaktadır (Akiyama ve ark.,2001; Dong ve ark.,2018). Tannik asitin özellikle kimyasal formülünde bulunan galloil grubunun (3,4,5-trihidroksibenzoil grubu) varlığı, antibakteriyel aktivitenin anahtarı olarak kabul edilir (Wang ve ark.,2018).

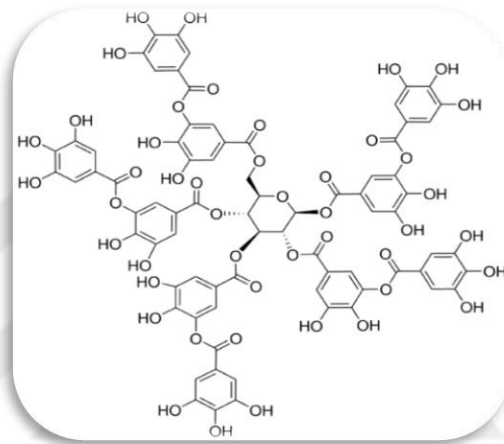
Polifenoller bitkilerin ikincil metabolitlerdir. Polifenollerin diğer bileşiklerden ayırt edici özellikleri ise suda çözünürlüğü, molekül ağırlığı, yapı ve polifenolik karakteri, metal iyonları (demir, bakır, alüminyum, kalsiyum vb.) ile kompleksleşmeleri, proteinler ve polisakkaritler gibi makromoleküller dahil olmak üzere diğer moleküller ile kompleks oluşturma yetenekleri ve yapısal özellikleridir.

Tannik asit, bitkilerin sekonder metabolizmasından üretilen hidrolize edilebilir bir polifenoldür özellikle; kolza, bakla, çay, kakao, kahve, ceviz, şarap, fındık, üzüm, çilek, meşe kabuğu, sumak gibi bitkilerden elde edilen, açık sarı- kahverengi toz, pul ya da süngerimsi bir kütle halindeki biçimsiz (amorf) maddelerdir. Tannik asit meyve, sebze ve içeceklerle tüketilerek vücuda alınan günlük ortalama 1-2 gram arası tüketildiğinde faydalı etkilere sahip bileşenlerdir. Tannik asit, alkollü içeceklerde, alkolsüz içeceklerde veya meyve sularında aroma maddesi olarak kullanılır. Antiseptik bileşikler olan tanenler tıpta, vazokonstriktif; tonsilit, faranjit, meme kanseri tedavisinde, hemoroid ve bazı dermatolojik hastalıkların ilaçlarının bileşiminde, sentetik tannik asitler egzama tedavisinde kullanılan preparatlar içinde yer alırlar (Sungur ve ark.,2008; Kolaç ve ark.,2017; Olgun ve ark.,2016; Lee ve ark.,2019; Kim ve ark.,2019).

Ayrıca ticari öneme sahip olan tannik asit tekstil, mikrobiyoloji, tıp, biyomalzeme bilimleri ve deri endüstrisinde özellikle doğal bir boya olarak kullanılmaktadır (Heijmen ve ark 1997; Kim ve ark.,2003; Saran ve ark.,2007; Albu ve ark.,2009; Burkinshaw ve ark.,2009;). Tannik asitin antikanserojen (Darvin ve ark.,2017), antiviral (Orlowski ve ark.,2014), antiprion (Hyeon ve ark.,2017), antimikrobiyal (Sahiner ve ark., 2016), antienflamatuar (Ninan ve ark.,2016) aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Tannik asit yüzeysel cilt enfeksiyonlarına neden olan *Streptococcus pyogenes*, kronik lenfadenopati ve hepatik veya dalak apseleri ile birlikte insanlarda şiddetli ishale neden olan *Yersinia enterocolitica* (Chung, 1993), ayrıca grip virüsünü inhibe ettiği bildirilmiştir.

Kim ve ark.,(2016) negatif yüklü tannik asit (TA) ve gümüş nanopartiküllerin (AgNP'ler) meydana getirdiği kompleksin *Staphylococcus aureus* 285 (MIC; 6,74 Ag/21,26 µg/ml tannik asit)'a, *Staphylococcus aureus* SG511 (MIC; 13,48 Ag /42,53 µg/ml tannik asit)'a, *Pseudomonas aeruginosa* 9027 (MIC; 6,74 Ag/21,26 µg/ml tannik asit)'ya, *Escherichia coli* TEM (MIC;13,48 Ag/42,53 µg/ml tannik asit)'e, *Salmonella typhimurium* (MIC; 6,74 Ag/21,26 µg/ml tannik asit)'a, *Klebsiella oxytoca* 1082E (MIC; 6,74 Ag/21,26 µg/ml tannik asit) suşlarına karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilediğini saptanmışlardır.



Resim 5. Tannik asitin kimyasal yapısı

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/tannicacid170120140155411?lang=en®ion=TR>, Erişim tarihi: 12 Şubat 2020).

Akiyama ve ark., (2001) tannik asitin *S. aureus* (MIC;4500 mg/L) suşuna karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilediğini saptanmışlardır.

Kim ve ark., (2010) tannik asitin *Salmonella typhi* 6539 (13 mm/zon), 'ye, *Salmonella typhimurium* 19585 (14 mm/zon), 'ye, *Salmonella typhimurium* 14028 (13 mm/zon), 'ye, *E. coli* 35150 (15 mm/zon), 'ye, *E. coli* 43890 (15 mm/zon), suşlarına karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilediğini göstermişlerdir.

Sahiner ve ark., (2016) tannik asitin *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* bakteri suşları ve *Candida albicans* suşuna karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilediğini saptanmışlardır.

Dong ve ark., (2018) tannik asitin in vitro koşullarda 50 adet (MSSA) ve 50 adet (MRSA) suşuna karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kim ve ark (2009) tannik asidin *E. coli O157:H7*'ye (2 mg/ ml) karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

4.1.6. Kaempferol

Flavonoid bir bileşik olan kaempferol (3,5,7-trihidroksi-2- (4-hidroksifenil) -4H-1-benzopiran-4-on), kimyasal formülüne sahip, düşük molekül ağırlıklı (MW: 286,2 g / mol) bitkisel kaynaklı gıdalarda (çay, brokoli, fasulye, domates, lahana vb.) ve geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan sarı renkte bir bileşiktir. Kaempferol içeren gıdaların tüketimi çeşitli hastalıkların insidansına fayda sağlamakta olup özellikle kardiyovasküler hastalıklar, kronik hastalıklar ve kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın gelişim riskini azaltmak amacıyla epidemiyolojik çalışmalarda kullanıldığı bildirilmiştir. Birçok çalışmada kaempferol glikozitleri veya kaempferol içeren bitkiler antioksidan, antiviral, antifungal ve antiprotozoal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Kaempferolün bazı mekanizmaları (nükleik asit sentezi, enerji metabolizması vb.) inhibe ederek antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır (Hendra et al., 2011; Calderón-Montaña ve ark.,2011).

Özcelik ve ark., (2006) kaempferol-3,7-O- α -l-dirhamnosidin *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*'ya karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

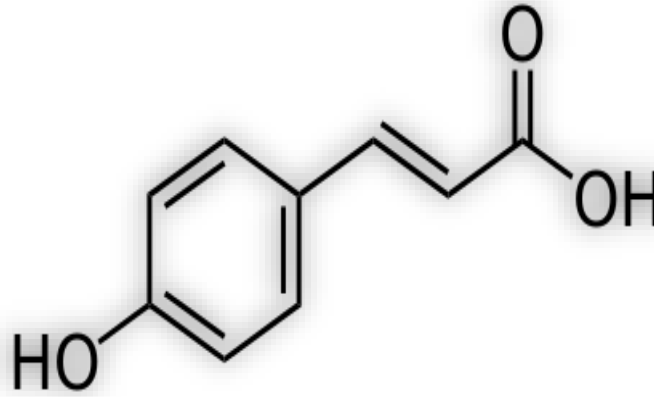
4.1.7. p-Kumarik asit

Bir fenolik asit olan p-Kumarik asit (4-hidroksisinnamik asit) fenilalanin ve tirozin aminoasitinden şikimat yolu ile biyolojik olarak sentezlenir, düşük toksisiteye sahiptir (LD50 = 2850 mg kg-1 vücut ağırlığı), diğer fenolik bileşiklerin öncüsü olup bitkilerde serbest veya konjüge edilmiş formda bulunabilmektedir. Serbest veya bağlı formda p-CA meyvelerde (ör. elma, armut, üzüm, portakal, domates ve çilek), sebzelerde (ör. fasulye, patates ve soğan, sarımsak) ve tahıllarda (örneğin mısır, yulaf ve buğday) bulunmakta olup geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan bir bileşiktir. p-Kumarik asitin ateroskleroz, yaralanma, anksiyete, gut, diyabet, oksidatif kardiyak hasarı, UV kaynaklı hasarların yanı sıra antioksidan, antienflamatuar, antimutajenik, anti-ülser, ve anti-kanser aktiviteleri gibi çeşitli biyoaktiviteler sergilediğini bildirmiştir. Çalışmamızda yer alan p-Kumarik asit antimikrobiyal aktivite gösterirken; çift hasar mekanizması ile ilk önce mikroorganizmada plazma membran geçirgenliğini önemli ölçüde artırıp hücre zarı geçirgenliğini değiştirirerek, bariyer fonksiyonunun kaybına yol açar daha sonra DNA çift sarmalı içindeki fosfat anyonuna tersiner olarak bağlanarak replikasyon, transkripsiyon ve ekspresyonu engelleyerek etki gösterdiği saptanmıştır (Hudson ve ark.,2000; Zang ve ark., 2000; Kiliç ve ark.,2013; Pragasan ve ark., 2013;; Kong ve ark.,2013; Pei ve ark.,2016).

Bag ve ark., (2017) Nisin / p-Kumarik asit kombinasyonunun *S. typhimurium*'a karşı antibiyofil ve antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Buna ilaveten Kot ve ark., (2015) trans-sinmaldehit, p-Kumarik asit ve ferulik asitin üropatojenik *E.coli*'ye karşı antibiyofil oluşumunu araştırılmışlardır. Araştırmacılar p-Kumarik asitin (% 0,25 ve% 0,5) idrar sonda fragmanlarında *E. coli* biyofil oluşumu üzerinde önleyici etkiye sahip olduğunu saptamışlardır.

Koç ve ark., (2014) ise Kumarin / p-Kumarik asit kombinasyonunun *S. aureus* ATCC 25923 (10 mm/zon)'a, *E. coli* ATCC 25922 (9 mm/zon)'ye, *P.aeruginosa* ATCC 27853 (8 mm/zon)'ya, *C.albicans* ATCC 10231 (12 mm/zon)'a karşı antifungal ve antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.



Resim 6. p-Kumarik asit kimyasal yapısı

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9008?lang=en®ion=TR>, Erişim tarihi: 12 Şubat 2020).

4.2. Çalışmamızda Yer Alan Patojen Mikroorganizmaların Genel Özellikleri

4.2.1. *Staphylococcus aureus*'un genel özellikleri

Micrococcaceae familyasında bulunan stafilokoklar yaklaşık 0,5 – 1,0 µm çapında optimal üreme ısıları 37°C'de, optimal pH'ları 7- 7.4 aralığında bulunan patojenik bir bakteri türüdür. 16S rRNA'nın DNA-ribozomal RNA (rRNA) hibridizasyonu ve karşılaştırmalı oligonükleotid dizilimine sahip, gram pozitif, Gram boyamada mor rengi alan, şekil itibariyle yuvarlak sıvı besiyerlerinde üzüm formunda görülmektedirler, ayrıca bazılarında polisakkarit yapıda kapsül bulunmaktadır, katalaz ve koagülaz pozitif, fakültatif anaerop, hareketsiz, toprakta, havada, suda ve bitkilerde yaşayabilmektedirler. (Foster,1996; Kateete ve ark.,2010; Johnson ve ark.,2016; Jenul ve ark.,2018).

Mannitol *S. aureus* 'un gelişimini desteklerken, aynı zamanda hemoliz yapma yeteneğiyle koloni etrafında fenol red ile belirlenen büyük parlak sarı pigmentli-opak koloniler oluştururlar. *S.aureus*'un mannitolü daima kullanmasıyla ve çeşitli şekerleri fermente etmesiyle asit oluşturduğu, ancak gaz oluşturmadığı bilinmektedir. Özellikle mannitol *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmeye yardımcı olur (Kateete ve ark.,2010; Boerlin ve ark.,2003; Jenul ve ark.,2018).

S.aureus'un patogeneze neden olan virölans faktörleri bulunmakta ve bunlar; konakçı dokuların kolonizasyonunu destekleyen yüzey proteinleri, fagositozu inhibe eden faktörler (kapsül, immünoglobulin), konak dokularına zarar veren ve hastalık semptomlarına neden olan toksinler olarak bildirilmektedir. *S. aureus* bakterisinin hücre duvarında bulunan a proteini bir yüzey proteini olup bakterinin bağışıklık sisteminden kaçmasını sağlayan fagositozu engellediği bildirilmiştir (Foster,1996).

Staphylococcus aureus'un neden olduğu hastalıklar; impetigo (iltihaplı deri enfeksiyonu), paronişya (dolama), fronkül (çıban), sivilce, osteomyelit, artrit, menenjit, *S. aureus*'a bağlı gıda zehirlenmesi ve sepsis, akut veya kronik farenjit, anjin, sinüzit, stafilokok pnömonisi, endometrit, servisit, otitis media, böbrek apseleri, piyelonefrit (Foster,1996).



Resim 7. MSA besiyerinde; *S. aureus* görüntüsü

(<https://microbenotes.com/mannitol-salt-agar-msa/>, Erişim tarihi: 13 Şubat 2020).

4.2.2. *Escherichia coli*'nin genel özellikleri

İnsan dışkı florasında genellikle memelilerin kalın bağırsaklarında bulunan fakültatif anaerop, gram boyamada pembe rengini alan, gram negatif, basil, kirpiklere sahip, hareketli, sporsuz bir bakteri olan *Escherichia coli* (*E. coli*), 0,1-0,5 eninde, 1,0–6 µm boyunda, genellikle kolonda kommensal olarak yaşamaktadır. *Enterobacteriaceae* familyasında bulunan *E. coli*'nin optimum üreme pH'sı 7 ile 7. 2 arasında, optimum üreme ısısı 37°C derecede olup 20-45°C derecede de üreyebilmektedir ve bu özelliği

sayesinde diğ er enterobakter türlerinden ayırt edilebilmektedir. Laktoz(+) içeren EMB agar besiyerinde üreyen *E. coli* kolonileri yeşil-metalik renkte ve S tipi koloniler meydana getirmektedir.  oğ  su u zararsızdır, ancak bazı su lar bakteriyofaj veya plazmid DNA kodlayan enterotoksinler ile patojenik hale gelmektedirler. K1 kapsüler polisakkarit antijenine sahip *E.coli* su ları özellikle septisemi vakalarının yaklaşık % 40'ına ve menenjit vakalarının% 80'ine neden olmaktadır (Ustaçelebi,1999; Bermudez ve ark.,1985; Braun ve ark.,2002; Makvana ve ark.,2015).



Resim 8. EMB besiyerinde; *E.coli* g r nt  

(<https://medium.com/@melvin.sanicas/prevention-of-e-coli-urinary-tract-infection-by-vaccination-f64040d47372>, Erişim tarihi: 12  ubat 2020).

Escherichia coli 'nin vir lans  zellikleri; Curli fimbrialar, adezinler (, P fimbrialar, S fimbrialar, afimbrial adezinler, Tip 1 Fimbrialar, Isıya Duyarlı Hemaglutininler), biyofilm oluşturma yetenekleri, toksinler, hemolizin, hareketlilik, kapsüler antijen, kolisin V plazmidi, serumun bakterisidal etkilerine karşı diren ililik ve kongo red ile boyanma en önemli vir lans faktörleridir. Vir lans faktörleri sayesinde birçok enfeksiyona neden olan *E.coli* bunlardan safra ve safra yolları enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonlar, abse, sinüzit, hemolitik üremik sendromları, yara enfeksiyonları örnek olarak verilebilir (Makvana ve ark.,2015).

4.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın genel özellikleri

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*), Psedomonadaceae ailesinin bir üyesi olan antibiyotiklere karşı dirençli ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. *P. aeruginosa* genellikle bitkiler, meyveler, toprak ve nehirler, göller ve yüzme havuzları cerrahi ekipman ve kateterler de dahil olmak üzere çeşitli habitatlarda kolonize olabilen, bir veya daha fazla polar flagellası ile hareket eden, optimum üreme sıcaklığı 37°C derece olan, ancak 24°C'de de üreyebilen bu özelliğiyle diğer patojen mikroorganizmalardan ayrılan, sporsuz, çubuk şeklinde, aerop olup bazı durumlarda nitratı kullanarak oksijensiz durumda hayatını devam ettirebilen, 0,5 – 1,0 µm genişliğinde, 1,5 – 5,0 µm boyunda, rRNA oligonükleotid dizilimine sahip, kapsülsüz, γ-proteobakteridir (Morrison ve ark., 1984; LaBauve ve ark., 2012; Peabody ve ark., 2003; Chevalier ve ark., 2017; Raba ve ark., 2018; Mielko ve ark., 2019).



Resim 9 MHA besiyerinde *Pseudomonas aeruginosa* görüntüsü

(<https://schaechter.asmblog.org/schaechter/2007/07/pseudomonas-aer.html>, Erişim tarihi: 12 Şubat 2020).

Pseudomonas aeruginosa, immün sistemi baskılanmış bireylerde ve kistik fibrozis (CF) hastalarında enfeksiyonlara neden olmaktadır. *P. aeruginosa* bazı virülans faktörleriyle enfeksiyon oluşturmaktadır. Bu virülans faktörleri lipopolisakkarit, kapsül, flagellum, tip IV pili, eksotoksin A, proteazlar, aljinat, slime faktörü, biyofilm

oluşturma yeteneği olup bağışıklık sisteminde farklı şekillerde etki etmektedir (Chevalier ve ark.,2017; Rocha ve ark.,2019).

4.2.4. *Klebsiella pneumoniae*'nin genel özellikleri

İnsan bağırsak florasının bir üyesi olan *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) gram negaif, basil, besiyerinde mukoid yapıda, hemoliz özelliği bulunmayan, aerop veya fakültatif anaerop, hareketsiz, sporsuz, laktozu fermente edebilen, M şeklinde kolonilere sahip, optimum üreme sıcaklığı 37° C derecede olup, sıcaklık 37 °C derecenin altına düştüğünde kapsül oluşturan, genellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan bir patojendir. *K. pneumoniae*'nin seçici besiyeri olarak kullanılan MacConkey besiyerinde üreme var ise üreyen bakterilerin rengi identifikasyonda yardımcı olmaktadır. şeffaf koloni oluşturan bakteriler laktoz negatif, kırmızı-pembe renkte oluşan koloniler laktoz pozitif olarak adlandırılmaktadır (Li ve ark.,2014).



Resim 10. MacConkey agarda *Klebsiella pneumoniae* görüntüsü

https://www.researchgate.net/publication/331651018_Klebsiella_pneumonia_growth_on_macconkey_agar_medium Erişim tarihi: 13 şubat 2020).

Klebsiella pneumoniae'nin şimdiye kadar tespit edilen virölans faktörleri arasında kapsüler polisakkaritler (CPS), lipopolisakkaritler, adezinler (tip 1 ve 3 pili, KPF-28 fimbriae, CF29K ve bir agregatif adezin), biyofilm oluşturma yeteneği ve demir alım sistemleri (sideroforlar) bulunmaktadır (Lundberg ve ark.,2013).

4.2.5. *Salmonella typhimurium*'un genel özellikleri

Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *Salmonella typhimurium* (*S.typhimurium*) gram negatif, sporsuz, 0,7-1,5µm eninde 2,0-5,0 µm boyunda, molekül ağırlığı yaklaşık 50,000 Da olan peritriş flagella yapısından dolayı hareketli, optimum sıcaklığı 37°C'dir,ancak 5–47 °C derece arasındada üreyebilen, fakültatif anaerop, 3,7-9,5 pH aralığında canlı kalabilen, % 8 tuz oranında yaşayabilen, basil şeklinde dünya genelinde en sık bildirilen gıda zehirlenmesi ve salmonelloza vakalarına neden olabilen bir bakteri türüdür (<http://www.fda.gov> 2011 ; Fadil ve ark.,2018; Das ve ark.,2018).



Resim 11. SS agarda *S. typhimurium* görüntüsü

<https://microbiologyinfo.com/salmonella-shigella-ss-agar-composition-principle-uses-preparation-and-result-interpretation/>, Erişim tarihi: 13 Şubat 2020).

4.3.Probiyotik Tanımı

Nobel Ödülüne sahip Rus bilim adamı Elie Metchnikoff, 20. yüzyılın başında probiyotiklerin devrimci keşfini yapmıştır. Bulgaristan ve Kafkasya'da yaşayan çiftçilerin sağlıklı ve uzun ömürlü olmalarını gözlemlemiş, bunun nedeninin tüketmiş

oldukları bol miktarda yoğurdun içeriğinde bulunan laktik asit bakterilerinin varlığına bağlamıştır. Metchnichkoff yapmış olduğu çalışmaların sonucunda *Lactobacillus bulgaricus* (*L. bulgaricus*)’u keşfederek probiyotik kavramını ortaya atmıştır. 1965 yılında Lilly ve Stillwell adlı araştırmacılar “probiyotikleri” bir organizma tarafından üretilen ve bir kültür ortamında başka bir organizmaya fayda sağlayan stimülasyon faktörleri olarak tanımlamışlardır (Amarna,2013).

Probiyotikler uzun bir süredir gıda ve süt ürünlerinde güvenle kullanılmaktadır. Son zamanlarda, spesifik hastalıkları önlemek, hafifletmek veya tedavi etmek amacı ile kullanım oranı artmıştır. 2002 yılında FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) ve WHO (Dünya Sağlık Örgütü) çalışma grubu uzmanları tarafından formüle edilen mevcut tanımı, probiyotiklerin “yeterli miktarlarda alındığında intestinal sistemi düzenleyerek konakçı sağlığı üzerine faydalı etkilere sahip canlı mikroorganizma suşları olarak bildirilmiştir (Hill ve ark.,2014).

4.3.1. Probiyotik mikroorganizmaların genel özellikleri

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü ile Dünya Sağlık Örgütü probiyotiklerin insan sağlığını olumlu yönde etkilediğini ayrıca terapötik ve profilaktik etkileri ile “fonksiyonel gıdalar” olarak adlandırdığını bildirmiştir. Ancak bakteri suşlarının antibiyotiklere karşı direnç spektrumları, metabolik ve hemolitik aktiviteleri, toksin üretme kapasiteleri, bağışıklık sistemi baskılanmış hayvan modellerindeki enfeksiyöz güçleri ve insanlardaki yan etkilerinin araştırılıp probiyotik bakteri suşlarının karakterize edilmesini önermişlerdir (Bonifait ve ark.,2009).

Probiyotik ürünler bir veya daha fazla seçilmiş mikrobiyal suş içerebilmektedir. Probiyotik mikroorganizmalardan; *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* ve bazı maya suşlarından *Saccharomyces* cinsi spor oluşturmayan, gram pozitif, basil formunda mikroorganizmalardır (Bonifait ve ark.,2009).

Probiyotikler klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Probiyotik bakteriler arasından özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri sağlıklı insanların mikrobiyotasında bulunan veya süt ürünlerinin içeriğinde yer alan faydalı etkileriyle probiyotik preparatların geliştirilmesinde en çok tercih edilen suşlar arasında bulunmaktadır (Linares ve ark.,2017).

Tablo 1. En sık kullanılan probiyotik mikroorganizmaların listesi (Heyman ve ark.,2002).

<i>Laktik asit bakterileri</i>	
Lactobacillus Türleri	<i>Lactobacillus cellobiosus, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus brevis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus gasseri</i>
Enterococcus türleri	<i>Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis</i>
Lactococcus türleri	<i>Lactococcus lactis</i>
Leuconostoc türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. Mesenteroides</i>
Streptococcus Türleri	<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus, Streptococcus intermedius</i>
Propionibacterium Türleri	<i>Propionibacterium shermanii, Propionibacterium freudenreichii</i>
Pediococcus türleri	<i>Pediococcus cerevisiae, Pediococcus acidilactici</i>
Diğerleri	
Bifidobacterium türleri	<i>Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum,</i>
Bacteriodes türleri	<i>Bacteriodes capillus, Bacteriodes suis, Bacteriodes ruminicola</i>
Bacillus türleri	<i>Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus coagulans, Bacillus clausi</i>
Küfler	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>
Mayalar	<i>Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces boulardi, Candida torulopsis</i>

Probiyotik mikroorganizmaların immünomodülatör özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Piqué ve ark.,2019).

Farklı probiyotik suşlar ve farklı probiyotik kombinasyonların savunma dereceleri birbirinden farklıdır bu değişkenin sebebi olarak herbir probiyotik mikroorganizmanın bakteriyel hücresel bileşenlerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Piqué ve ark.,2019). Günümüzde, yeni terapötiklerin tasarımında probiyotik bakterilerin hücre duvarı bileşenlerinin biyolojik aktivitelerini anlamak önemlidir. Peptidoglikan ve lipoteikoik asitler, gram-pozitif bakterilerin ana hücre duvarı bileşenleridir ve çoğu probiyotiğin immünomodülatör ve antimikrobiyal etkileri için önemli bileşenler olarak düşünülmektedir (Piqué ve ark.,2019).

Peptidoglikan tabaka; bakteri hücresinin şeklini ve bütünlüğünü koruyan önemli bir polimerdir. Peptidoglikan tabakasının elastik yapısı, yüksek turgor basıncına karşı bakterinin daha dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Ayrıca probiyotik mikroorganizmalarda su, mineral maddeler (tuz vb.), ve metabolitleri geçirebilen peptidoglikan tabakası büyük moleküllerin bakteri hücreğine girmesini engellemekte ve aynı zamanda büyük proteinlerin salgılamasını kısıtlamaktadır (Sengupta ve ark.,2013).

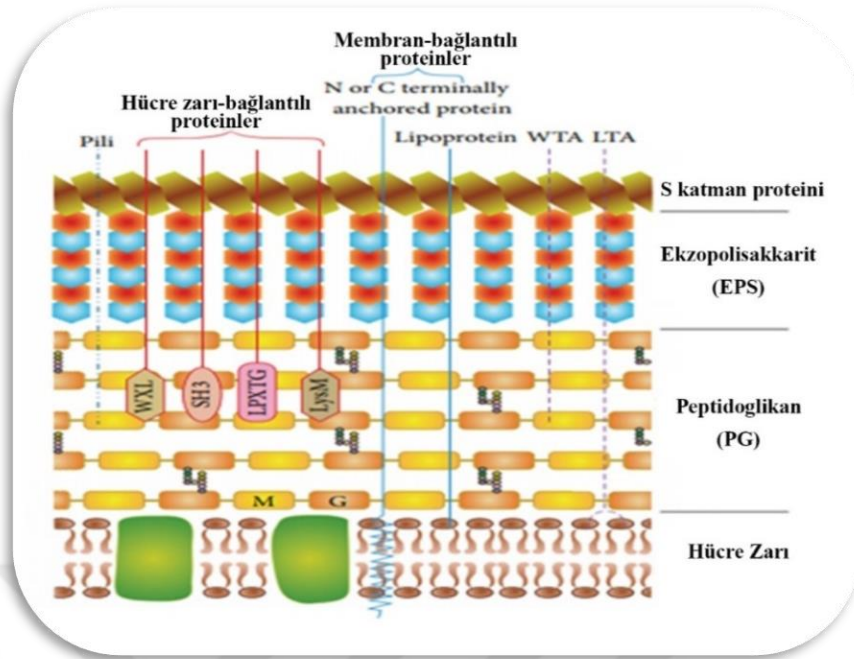
Teikoik asit ve Lipoteikoik asit ; probiyotik mikroorganizmaların hücre duvarında bulunan, tekrarlanan gliserol veya ribitol fosfat birimlerinden oluşan ikinci ana bileşendir. Teikoik asit peptidoglikan tabakaya kovalent bağlar ile lipoteikoik asit ise lipidler aracılığıyla sitoplazmik membrana bağlanan anyonik polimerlerdir. Teikoik asit hücre duvarının antijenik karakterinden, bağırsak adhezyon yeteneğinden ve negatif yükünden sorumludur. (WTA) azotlu maddelerin parçalanması ve çoğalmada rol alan proteaz enzimlerine sahiptirler LTA'ler hücre duvarının anyonik karakterine katkıda bulunur. Hidrofobiklik bağlar, bu da hücre duvarının yapışkanlığını etkilemektedir (Sengupta ve ark.,2013).

Hücre Duvarı Polisakkaritleri (Ekzopolisakkaritler); Ekzopolisakkaritler (EPS) bakteriyel hücre yüzeyinde kapsül formunda bulunan, dallanmış tekrarlı şeker

birimleri ve şeker türevlerini içeren probiyotik mikroorganizmaların mideden bağırsağa geçişinde canlı ve stabil kalmasını sağlayan hücre dışı polisakkaritlerdir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* dahil olmak üzere birçok bakterinin yüzeyinde bulunan ekzoselüler moleküllerdir. EPS ana bileşenleri glikoz, galaktoz, ramnoz, N-asetil-glukozamin ve N-asetil-muramik asittir. EPS biyofilm oluşumunda rol oynayan ana maddedir. Bakteriler çevresel strese korunma amaçlı biyofilm oluşturmaktadır. Hem patojenik hem de komensal bakterilerin insan mukozasında biyofilm ürettiği tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu bakteriyel enfeksiyon ile ilişkili olsa da probiyotik mikroorganizmalar için koruyucu bir rol üstlenmektedir. Ekzopolisakkaritin metal iyonlardan, lizozim etkinliğinden, nisin aktivitesi gibi antimikrobiyal ajanlardan koruduğu bildirilmiştir (Ruas-Madiedo ve ark.,2006).

Pili ve Flagella; Bağırsak epitel dokusuna ve mukozal yüzeylere yapışabilme, probiyotiklerin seçilmesinde anahtar kriterlerdendir. Bakteriler, aderansa aracılık eden çok sayıda yüzey bileşenini sahiptir. Pili veya fimbrialar, bakteriyel yapışmayı başlatan, konakçı ile etkileşime aracılık eden, bağırsakta canlı kalma sürelerini uzatan, invazyon, agregasyon ve biyofilm oluşumunda rol oynayan yüzey yapışkan bileşenlerdir. Flagellum, bir ligand olarak görev yapan bakterilerde hareketi sağlayan, flagellin adı verilen protein yapıda polimerlerinden oluşmaktadır (Krishnan ve ark.,2016).

S katmanı; Hücreyi çevreleyen ana hücresel proteinleri oluşturan S-katman proteinleri, gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin dışında düzenli yapılar halinde bulunan hücre yüzey proteinleridir. S-katmanları, 40 ila 200 kDa arasında bir moleküler kütleye sahip, S-proteini olarak bilinen (gliko) proteinlerden oluşmaktadır. S katman proteinleri olumsuz çevre koşullarına ve farklı stres faktörlerine karşı adaptasyon ve dayanıklılık sağlamaktadır. S katmanı hücreyi pH değişimine ve osmotik basınca karşı korumaktadır (Frece ve ark.,2005).



Şekil 1. Laktik asit bakterilerinin hücre duvarı ve membranı ile ilişkili proteinleri (Sengupta ve ark.,2013 alıntı).

4.3.2.Probiyotik suşlar için seçim kriterleri ve gereklilikler

Günümüzde probiyotik ürün ve preparat pazarı gün geçtikçe büyümekte, özellikle probiyotik suşlar gıda sanayisi, ilaç sanayisi ve nutrasötik endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda, probiyotiklerin kendine özgü özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Probiyotik olarak seçilebilmesi ve kullanılabilmesi için aşağıdaki kriterleri sağlamalıdır (Markowiak ve ark.,2017).

Tablo 2. Probiyotik suşların seçim kriterleri (Markowiak ve ark.,2017).

Kriterler	Gerekli özellikler
Güvenlik kriterleri	İnsan veya hayvan kökenli olmalı, Sağlıklı bireylerin gastrointestinal sisteminden izole edilebilmeli, Probiyotik mikroorganizmanın fenotip ve genotip özellikler tanımlanmalı, Bulaşıcı hastalıklar ile bağlantısı bulunmamalı, Safra tuzuna ve mide asidine karşı dayanıklı olması, Yan etkileri bulunmamalı, Antibiyotik direncinden sorumlu genler bulunmamalı, Toksijenik olmamalı.
Fonksiyonel kriterleri	Bağırsak ekosisteminde yaşayan mikrobiyotada rekabet yeteneği bulunmalı ve stabil olmalı, Bağırsak ekosisteminde hayatta kalmalı ve metabolik aktivitelerini sürdürmeli, Safra tuzlarına ve enzimlere karşı dirençli olmalı, Midedeki düşük pH'a karşı dirençli olmalı, Bağırsak ekosisteminde yaşayan patojenik mikrobiyal türler ile rekabet edebilmeli, Patojenlere karşı antagonistik aktiviteye (örn., <i>Helicobacte pylori</i>, <i>Salmonella spp.</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Clostridium difficile</i>) sahip olmalı, Patojen suşlara karşı antagonistik etkileri olmalıdır. Antimikrobiyal maddeler propiyonik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin, laktik asit gibi organik asitleri üretebilmeli.
Teknolojik kriterler	Genetik kararlılığa sahip olmalı, Bakteriyofajlara karşı dirençli olmalı, Bitmiş ürünler istenilen duyusal özelliklere sahip olmalı, Bitmiş ürünler yüksek depolama ömrüne (aerobik ve mikro-aerofilik koşullarda) sahip olmalı.

4.3.3. Probiyotik / konakçı etkileşim mekanizmaları

Probiyotikler, bağırsak epitelyal bariyer fonksiyonunu iyileştirilmekte, immünomodülatör yanıtları düzenlemekte, toksin reseptörlerini bozmakta, besin maddeleri için rekabete girmekte, inhibitör maddeler üretmekte, adezyon bölgeleri bloke ederek çeşitli mekanizmalar kullanarak patojenleri inhibe etmektedirler (Luis Balca'Zar ve ark.,2006).

- **İnhibitör bileşiklerin üretimi**

Probiyotik mikroorganizmalar hidrojen peroksit, organik asit, diasetiller, bakteriyosinler veya bakteriyosin benzeri molekülleri üreterek patojen bakteriler üzerine antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Rastall ve ark.,2005).

- **Temel besin maddeleri için patojen mikroorganizmalar ile rekabet etmek**

Probiyotik ve patojen mikroorganizmalar arasında temel besin maddeleri için rekabet bulunmaktadır. Probiyotikler mikroorganizmalar, patojenlerin üremesi için gerekli olan besin maddelerini tüketerek üremelerini inhibe etmektedir. Besin emilim hızı, doğal metabolik hız, büyüme hızı ve spesifik inhibitörlerin salgılanmasına bağlı olarak mikroorganizmalar etkileşime girmektedir (Rastall ve ark.,2005).

- **Probiyotik mikroorganizmaların kolonizasyon için rekabeti**

Probiyotik mikroorganizmalar kolonizasyonu önlemek amacı ile olası bir mekanizma kullanarak, bağırsak mukozası veya diğer epitel yüzeylerindeki yapışma yerleri için rekabete girmekte ve o bölgelerde patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engellemektedir (Rastall ve ark.,2005).

- **Probiyotik mikroorganizmalar pH'yı düşürerek patojenleri inhibe etmesi**

Patojen mikroorganizmaların gelişimini engellemek amacı ile probiyotik mikroorganizmalar bazı organik asitler sentezlemektedir. Probiyotik mikroorganizmalardan *Lactobacillus* suşlarının özellikle organik asitlerden asetik ve laktik asit gibi metabolitleri üreterek pH'ı düşürdüğü ve bakteriyel patojenlerin büyümesini engellediğini bildirmişlerdir. Bu organik asitler ortamın pH'sını düşürerek

ortamı asidik hale getirir ve böylece patojen mikroorganizmanın o bölgede kolonize olmasını engellemektedir (Domitille Fayol-Messaoudi ve ark.,2005).

- **Gastrointestinal sistemi metabolize eden enzimlerin aktivitesini arttırarak etki göstermektedir** (Rastall ve ark.,2005).
- **Bağırsak mikrobiyotasının ve bağışıklık yanıtının modülasyonu;** Probiyotik suşlar ile bağışıklık yanıt modüle edilmekte, gastrointestinal sistemi iyileştirmek amacı ile makrofajlar aktive edilip, antikor üretimi arttırılmaktadır böylece bağışıklık sistemi güçlendirilmektedir (Rastall ve ark.,2005).
- **Toksin reseptörünün bozulması:** Probiyotik mikroorganizmalar bağırsak mukozası üzerindeki toksin reseptörlerini etkisiz hale getirerek etki etmektedir. Örneğin; *S. boulardii*, *C.difficile*'nin üretmiş olduğu toksin A maddesininin toksin reseptörüne bağlanmasına engel olarak kolonize olmasını engellemiştir (Rastall ve ark.,2005).

4.4. Çalışmamızda Yer Alan Probiyotik Mikroorganizmaların Genel Özellikleri

4.4.1. *Lactobacillus acidophilus*'un genel özellikleri

Lactobacillus acidophilus (*L. acidophilus*), Lactobacilli cinsine ait bir türdür. Gram pozitif, glikozu homofermentatif ile katabolize ederek parçalaması sonucu % 90 laktik asit % 10 CO₂ meydana getiren, çubuk şeklinde bir mikroorganizma türüdür. *L. acidophilus* diğer laktik asit bakterileri gibi şekerleri laktik aside fermente eder. Bu probiyotik bakterivdüşük pH seviyelerinde (5,0'ın altında) gelişebilmekte ve optimum büyüme sıcaklığı 37°C derecedir. Mikroaerofilik olduğundan, aerobik olarakta büyüebilmektedir, ancak % 5 CO₂, % 10 H₂O ve% 85 N içeren anaerobik koşullar altında daha iyi gelişmektedir (Robinson, 2005).

(https://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_acidophilus, Erişim tarihi: 16 Şubat 2020).

Lactobacillus acidophilus'un insan sindirim sisteminde sağlıklı yararları bulunmaktadır. *L. acidophilus*'un faydaları: kan basıncını ve kolesterolü iyileştirmek, viral, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlarla mücadele etme, alerjik aktiviteyi azaltmak, sindirim sistemine yardımcı olmak vs birçok faydası bulunan laktik asit bakterisidir. Bu özellikleri ile *L. acidophilus* en çok çalışılan probiyotik mikروorganizmalar arasındadır. Aynı zamanda gıda endüstrisinde en yaygın kullanılan probiyotik türlerinden biridir (Değirmenci 2017).

Lactobacillus acidophilus'un bağırsak mukozasına tutunmasını sağlayan sitoplazmik membran kökenli pili ve flagellası bulunmaktadır. Bu uzantılar *L. acidophilus*'un hareket etmesine ve belirli substratalara yapışmasına yardımcı olmaktadır. Hücre duvarı dört önemli bileşenden oluşmaktadır (Jafarei ve ark.,2011).

Bunlar; peptidoglikan, teikoik asitler, S-katmanı ve polisakkaritlerdir. Peptidoglikan (murein) *L. acidophilus*'un hücre duvarının (Gram pozitif bakteriler gibi) önemli ve spesifik bir bileşenidir. Plazma zarının dışında ağ benzeri bir tabaka oluşturan peptidoglikan şeker ve amino asitlerden oluşmaktadır. Şeker bileşenleri, β - (1, 4) bağlantılı N-asetil-glukoz-amin ve N-asetil-muramik asittir. Peptidoglikan (murein) tabaka teikoik asit gibi diğer hücre duvarı bileşenlerini sabitlemek için bir iskele görevi görmektedir. Hücre büyümesi ve hücre bölünmesi süreçlerinde yakından rol oynadığı bildirilmiştir. *L. acidophilus*'un peptidoglikan tabakası, bakterinin neden olduğu bazı bağışıklık tepkilerinden sorumludur. Doğuştan gelen bağışıklık sistemini tanımak için mükemmel bir hedef bölgesidir. Peptitoglikanın tanınması, vücudun doğal savunmasını destekler ve bağırsak yolundaki bağışıklık tepkilerini uyarır. Peptidoglikan çok sayıda proteini uyararak, koruyucu inflamatuvar yanıtı neden olmaktadır (Jafarei ve ark.,2011).

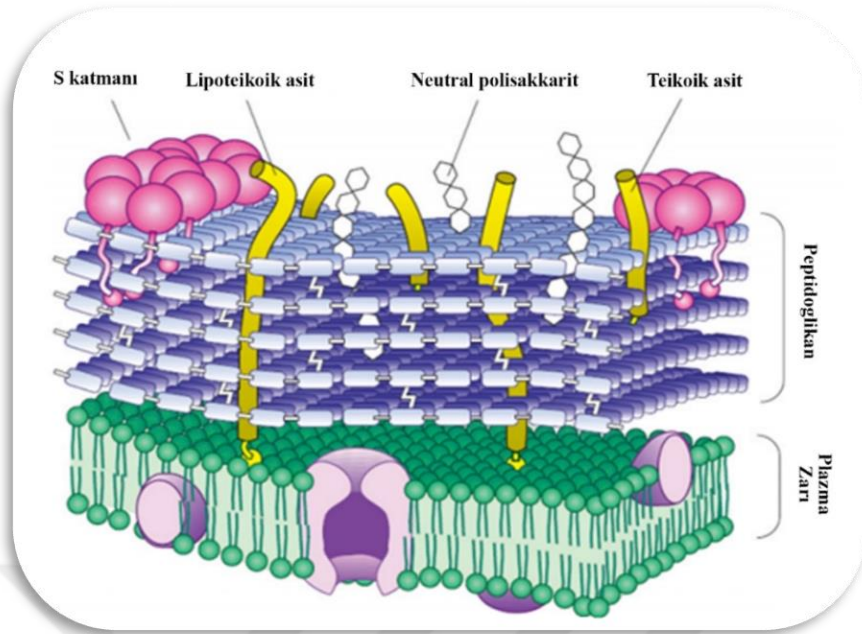
Lactobacillus acidophilus 'un teikoik asitleri (TA) hücre duvarı ağırlığının % 50'sin oluşturmaktadır. Lipoteikoik asit otolizinlerin (muramidazlar) faaliyetlerini modüle etmek, enzim fonksiyonları için gerekli olan katyonların (özellikle Mg) atılmasını sağlamak, hücre duvarının elektromekanik özelliklerini düzenlemek, bakteriyel

yüzeye verdiği negatif yük ile epitelyal hücrelere (EC) yapışmaya aracılık etmek ve güçlü bir immünojen olarak işlev görmektedir (Jafarei ve ark.,2011).

İnsanlardan veya hayvanlardan izole edilen *L. acidophilus* suşlarının S katmanına sahip olduğu bildirilmiştir. S-katmanları, proteinler veya glikoproteinlerden (25 ila 220 kDa) meydana gelmektedir. Saflaştırılmış S-tabakalarının pH, radyasyon, sıcaklık, proteoliz, yüksek basınç ve deterjan işlemlerine karşı kararlı olduğu bildirilerek, bu yüzeysel yapıların olumsuz çevre koşullarına karşı bir koruma kalkanı olarak görev yaptığı bildirilmiştir. Bu katmanlar *L.acidophilus* 'un hücre şeklinin belirlenmesi ve sürdürülebilmesi, mukusa, hücre dışı matris proteinlerine (ECM) ve epitel hücrelerine yapışması, hücre duvarında bulunan faj reseptörlerini örtmek için bir kalkan görevi görmesi, moleküler bir elek olup, enzimler gibi yüksek molekül ağırlıklı hücre dışı proteinler için iskele görevi görmesi ve bağışıklık hücreleriyle spesifik etkileşime girerek, sitokin indüksiyonu ile işlevlerini düzenlemesinden sorumlu önemli bir katmandır (Jafarei ve ark.,2011).

Lactobacillus acidophilus 'un hücre dışı polisakkaretlerinden EPS'nin mikrobiyal hücreyi fagositozdan, faj saldırısından, protozoonlardan ve ozmatik stresten koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca EPS'in katı yüzeylere yapışma, biyofilm oluşumu ve hücrel tanımda rol oynadığı bildirilmektedir. (Jafarei ve ark.,2011).

Lactobacillus acidophilus, antimikrobiyal aktivite gösterirken bakterinin hücre duvarında bulunan reseptöre tutunur ve bakteriyosin adı verilen peptit inhibitörlerini salgılar. Özellikle *L. acidophilus* küçük bir peptit olan bakteriyosin olarak adlandırılan laktasin B üreterek antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Jafarei ve ark.,2011).



Şekil 2. *L. acidophilus*'un hücre duvarı yapısı (Jafarei ve ark.,2011 alıntı).

4.4.2. *Lactobacillus rhamnosus*' un genel özellikleri

Lactobacillus rhamnosus, gram pozitif, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerop veya mikroaerofilik, katalaz negatif bir bakteridir. Mezofilik bakterilerden *Lactobacillus rhamnosus* suşa bağlı olarak kültürleri 15 °C'den düşük veya 40° C'den yüksek sıcaklıklarda büyüebilmektedir. Büyüme için optimum başlangıç pH değeri 6,4 ila 4,5 arasındadır. Mikroskopik görüntüsü çubuk, birden fazla çubuk veya kısa zincirler halinde görülmektedir. Hücrelerin boyutu 0,8 ila 1,0 µm genişliğinde ve 2,0 ila 4,0 µm uzunluğundadır (Valík ve ark.,2008).

Laktik asit bakterilerinden *L. rhamnosus* glikozu hekzozmonofosfat yoluyla parçalayıp laktik asit, asetik asit, etanol, CO₂ gibi yan ürünler oluşturan heterofermentatifler olarak bilinmektedirler (Valík ve ark.,2008).

Lactobacillus rhamnosus konakçı hücrelerin mukus glikoproteinlerine yapışmayı sağlayan daha sonrada gastrointestinal sistemde kolonizasyonuna aracılık eden fimbriyalara (pili) sahiptir. *L. rhamnosus* ile yapılan çalışmalarda, mukus bağlanma faktörlerin (MBF) adezyonda yardımcı yapılar olduğu bildirilmiştir (Chapot-Chartier ve ark.,2014).

Yapılan çalışmalarda bakteriyel yüzey adezinlerinin gastrointestinal sistemde probiyotik mikroorganizmaların kalıcılığını destekleyebileceğini bildirmişlerdir. Peptit zincirleri N-terminalleri aracılığıyla kovalent olarak muramik asitin laktik grubuna bağlanırlar. Bu peptidik zincirler, türler arasında bileşim bakımından farklılık gösterir ve üç boyutlu bir yapı oluşturur ayrıca bakteriyel bütünlüğü sağlayan bir veya daha fazla amino asidin kısa zincirleri yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak çapraz bağlanabilir (Chapot-Chartier ve ark.,2014).

Sağlıklı insan bağırsak mikrobiyotasından izole edilen probiyotik mikroorganizmalardan *L.rhamnosus*'un bağırsak mukozasının bileşenlerine çok iyi yapıştığı, böylece gastrointestinal sistemde (GIT) geçici kolonizasyonunu sağladığını ve biyofilm oluşturduğunu bildirilmiştir. Konakçı ve abiyotik yüzeylerle doğrudan etkileşime aracılık eden SpaCBA-pilus adezin ve biyofilm yapısını güçlendiren MabA (yapışma ve biyofilm modülatörü) in vitro koşullarda *L. rhamnosus*'un biyofilm oluşumuna aracılık eden merkezi faktörler olarak kabul edilir. Yapışma ve biyofilm oluşumunun modülatörü olan MabA (LGG_01865), yüzey ile pilus aracılı etkileşimin ardından biyofilm yapısını güçlendirdiği bildirilmiştir (Chapot-Chartier ve ark.,2014).

4.4.3. *Lactobacillus plantarum* ' un genel özellikleri

Sebze, meyve, et ve sütün fermentasyonunda sıklıkla kullanılan laktik asit bakterileri, ekmek hamuru fermentasyonunda ekmeğin dokusunun iyileştirilmesinde, fermente gıdaların korunmasında ayrıca yiyeceklerin bozulmasını engelleyerek raf ömrünün uzatılmasında görev almaktadır. *L. plantarum* gram pozitif, katalaz negatif, anaerob veya mikroaerofilik, hücreleri yuvarlak, genellikle 0,9–1,2 µm genişliğinde ve 3–8 µm uzunluğunda, tek tek, bazen çiftler halinde veya kısa zincirler halinde bulunan basil formda mikroorganizmalardandır. *L. plantarum*, laktik asit bakterileri arasında büyük bir genom (~ 3,3 Mb) sahip çok yönlü bir türdür. *L. plantarum* sindirim sistemi, gastrointestinal sistem, vajinal ve ürogenital yollar gibi çeşitli sert koşullara karşı son derece toleranslıdır. *L. plantarum* düşük pH'a karşı yüksek bir toleransa sahiptir. Bu nedenle, pH'ın genellikle 4.0'ın altında olduğu durumlarda laktik asit bakterilerinden. *L. plantarum* hayatta kalmayı başarmakta ve fermente gıdalarda sıklıkla baskın olarak

bulunmaktadır. Genellikle pH aralığı 4 ile 8,8 aralığında, üreme sıcaklığı ise 12 °C ila 40°C derecede büyüme gösterdiği bildirilmiştir (Matejčeková ve ark.,2016).

Lactobacillus plantarum genellikle insanda ve diğer memeli gastrointestinal sistemlerinde, tükürükte ve çeşitli gıda ürünlerinde bulunmaktadır. *L. plantarum* 'un kültür ortamında üremesi kolaydır. Bu nedenle, güvenli bir probiyotik olduğu düşünülen *L. plantarum* gıda endüstrisi uygulamalarında araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmektedir. Ayrıca, *L. plantarum*, herhangi bir yan etkiye neden olmadan insan tıbbına önemli ölçüde katkıda bulunarak ilaç endüstrisinin yaygın uygulamalarına sahiptir. Ek olarak, son araştırmalar *L. plantarum*'un bir aşı aracı olarak kullanılabileceğini bildirmektedir (Abdelazez ve ark.,2018).

Lactobacillus plantarum 'un peptidoglikan tabakası lizozime karşı direnç sağlamaktadır. Hücre duvarında bulunan teikoik asit ve lipoteikoik asit hücre bölünmesinde, bakteri morfogenez, protein sekresyonunda görev almaktadır. Ayrıca polisakkaritler immünsüpresif fonksiyonlarda işlevsel olmaktadır (Chapot-Chartier ve ark.,2014). *L. plantarum* tarafından üretilen en önemli biyoaktif bileşiklerden biri (EPS) 'dir. EPS'lerin, diğer hücre yüzeyi adezinlerini koruyarak yapışma üzerinde dolaylı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. EPS'ler hücreler arası etkileşimleri ve mikrokolonilerin oluşumunu teşvik edebilir, ancak bu adım diğer birçok içsel ve çevresel faktöre de bağlıdır. *L.plantarum* WCFS1'de, EPS üretimini ve uyumu düzenleyen lamBDCA tarafından kodlanan agr benzeri bir 2CRS düzenleyici sistem tanımlanmıştır. Son zamanlarda, bazı araştırmacılar *L.plantarum* ekzopolisakkaritinin antibiyofilm, antioksidan, antimikrobiyal, antitümör ve immünostimülatör aktivitelerine sahip olduğunu bildirmiştir. Ayrıca *L.plantarum* biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Özellikle *L.plantarum* 'da yer alan düzenleyici genlerden ccpA geni biyofilm oluşumunda rol oynamaktadır (Ramraj ve ark.,2015; Abdelazez ve ark.,2018).

4.4.4. *Lactobacillus fermentum* ' un genel özellikleri

Fermantasyona neden olduğu için *Lactobacillus fermentum* olarak adlandırılmaktadır. *L.fermentum* zorunlu olarak heterofermentatif insan bağırsak mukozasında bulunan bir türdür. *L.fermentum*, doğal peynir altı suyu kültürlerinde bulunan en bol probiyotik mikroorganizmardan biridir. *L. fermentum*, gram pozitif, katalaz negatif, çubuk şeklinde bir laktik asit bakterisidir. Hayvan ve bitki materyallerinin fermantasyonunda, hamur mayasında yaygın olarak bulunur. *L.fermentum* un farklı pH konsantrasyonlarında teste tabi tutulmuş pH 3 seviyeli bir çözelti içinde inkübe edildikten birkaç saat sonra büyüme ve hayatta kalma kabiliyeti ile güçlü bir pH toleransına sahip olduğu bildirilmiştir. *L. fermentum* 'un sert koşullarda hayatta kaldığı ve probiyotik olarak önemli bir starter suş olduğu bildirilmiştir (Mikelsaar ve ark.,2009; Ibrahim, S. A. (2016).

Bağırsak epitel hücreleri konakçı ile lümen arasında bir bariyer oluşturur ve koruyucu mukus tabakası ile kaplanır. Mukus tabakası gastrointestinal sistemde, bakterilere kısa bir kalış süresi sağlar, yapısı nedeni ile patojenlerin o bölgede kolonizasyonuna engel olmaktadır. *L. fermentum* ile yapılan çalışmalar sonucunda mukusa yapışmaya aracılık eden 32 KDa büyüklüğünde yüzey ilişkili bir proteinin (32-mMubp) görev aldığı bildirilmiştir (Sengupta ve ark.,2013).

4.4.5. *Lactobacillus kefir* ' nin genel özellikleri

Lactobacillus kefir, diğer ana süt heterofermentatif laktobasillerden daha sınırlı kaynaklardan izole edildi bildirilmiştir. Esas olarak bira, kefir içeceği ve kefir tanelerinde yoğun olarak bulunmaktadır. *L. kefir* gram pozitif, aerop veya fakültatif anaerop, çubuk şeklindeki bir bakteridir. *L.kefir* 15°C'de gelişebilmekte, ancak optimum üreme ısısı 30-37°C'dir. *L. kefir* yuvarlak uçlu kefir çubuklar, kısa çubuklar (3 mm) veya uzun filament benzeri (15 mm) zincirlerden oluşurlar. *L .kefir*, bakterilerin ve maya hücrelerinin gömüldüğü kefir tanelerinin önemli bileşeni olan ekzopolisakkarit sentezine de katkıda bulunur. Garrote ve arkadaşları, *L. kefir*'de bulunan S-tabakası proteinlerinin varlığını vurgulamıştır. S-katman proteinlerinin, *Lactobacillus kefir* bakteriyel hücrelerinin kefir tanelerinde bulunan mayalarla

etkileşime aracılık ettiğini ve adezyonda görev aldığını açıklamışlardır (Carasi ve ark.,2014; Ibrahim, S., 2016).

Tablo 3. Konakçı/ Mikroorganizma etkileşimlerinde rol oynayan hücre yüzey faktörleri (Sengupta ve ark., 2013).

<i>Lactobacillus</i> suşları	Mekanizma ve etki	Hücre yüzey proteinleri	Hedef hücreler
<i>L. acidophilus</i>	Aderans ve agregasyon, patojen inhibisyonu, bariyer fonksiyonunun sürdürülmesi ve immünomodülasyon	Mukus bağlayıcı protein (Mub), fibronektin bağlayıcı protein (FbpA), S-katman proteinleri (SlpA), LTA ve EPS	Epitel hücreleri ve mukus, fibronektin, ECM bileşenleri ve Caco-2 Hücreler
<i>L. plantarum</i>	Aderans, epitelyal bariyer fonksiyonunun artırılması ve immünomodülasyon	Mannoz spesifik adezin (Msa), GAPDH	Epitel hücreleri ve mukus, Caco-2 hücreleri
<i>L. rhamnosus</i>	Aderans, patojene karşı koruma ve bağırsak epitel hücreleri üzerinde antiapoptotik etkiler	Fimbria, mukus bağlama faktörü (MBF)	Mukus glikoproteinleri, bağırsak epitel hücreleri
<i>L. kefir</i>	Patojen ve stres faktörlerine karşı koruma	S-katman proteinleri	Caco-2 / TC-7 hücreleri
<i>L. fermentum</i>	Aderans	Mukus bağlayıcı protein (32-mMubp)	Mukus
<i>L. reuteri</i>	Aderans, patojen inhibisyonu ve epitelyal bariyer fonksiyonunun artırılması	Aderans, patojen inhibisyonu ve epitelyal bariyer fonksiyonunun artırılması	Epitel hücreleri ve mukus, kollajen

4.4.6. *Bifidobacterium* spp. 'nin genel özellikleri

Bifidobacterium ilk olarak 1900 yılında Freshman Tissier tarafından tanımlanmış ve *Bacillus bifidus* olarak adlandırılmıştır. *Bifidobacterium* cinsi, *Bifidobacteriaceae* familyası içindeki beş cinsden biridir. *Bifidobacterium*, insan oro-gastrointestinal sistem ve vajinada bulunan, özellikle anaerobik metabolizmaları ve oksijene duyarlılıkları göz önüne alındığında, gastrointestinal sistemdeki bifidobakteriler

ağırlıklı olarak kolonda bulunmaktadır. Bifidobakteriler gram-pozitif, anaerop, dallı, çubuk şeklinde, 0,5-1,3 µm eninde 1,5-8,0 µm boyunda, üreme sıcaklığı; 37°C ile 40 °C derecede, 2 ila 3 günde üreyen, spor oluşturmeyen bir bakteridir (Esaïassen ve ark.,2017; Quigley, 2017).

Bu bakteriler ilk olarak bebek dışkılarından izole edilmiş ve konakçı organizma için önemli fizyolojik önemi nedeniyle dikkat çekmiştir. (Esaïassen ve ark.,2017; Quigley, 2017).

Bifidobakterilerin probiyotik olarak gastrointestinal sistemde hareket etme yetenekleri bulunmaktadır. Genel olarak bifidobakteriler için gösterilen homeostatik ve faydalı etkiler sırasıyla şöyledir; patojenlere karşı koruma, bağırsak bariyerinin arttırılma, suda çözünür vitaminlerin sentezi, bitki oligo- ve polisakkaritlerin sindirimi, potansiyel olarak toksik ve kanserojen metabolitlerin üretimini baskılamak ve konakçı bağışıklık tepkisini modüle ederek, bir antienflamatuar ortamı teşvik etmedir (Quigley, 2017).

Bifidobakteriler, bağırsak florasını yeniden dengeleyerek ve gıda kalıntılarının anormal bakteriyel fermantasyonunu önleyerek kabızlık, karın ağrısı, şişkinlik gibi semptomları hafifletmede etkinlik göstermektedir. *Streptococcus thermophilus*, *L. acidophilus* ve *L. rhamnosus* ile birlikte spesifik *B. infantis* ve *B. lactis* suşları, bebeklerde akut gastroenterit semptomları hafifletmede etkinlik göstermektedir (Sarkar ve ark.,2016).

Bifidobakteriler kabızlığı ve kanser de dahil olmak üzere geriatric hastalıkları önlemek, antibiyotikle ilişkili ishalleri önlemek ve tedavi etmek, bağışıklık tepkisini uyarmak, böylece enfeksiyona karşı daha büyük bir direnç katkıda bulunmak vb bir çok faydalı etkiye sahiptir (Mitsuoka,1990).

Bakterilerde bağırsak mukozasına yapışma, sağlığın teşvik edici etkilerini gösterme ve bağısakta uzun süre kalabilmesi için önemli bir faktördür. *B. bifidum*'un epitel hücrelerine yapışmasına aracılık eden yüzey lipoprotein BopA yapıları bulunmaktadır (Sarkar ve ark.,2016).

Son çalışmalarda, *B. longum subsp. longum*'un GI epitelyumuna fimbrial uzantılarla bağlandığı gösterilmiştir. *B. longum subsp. longum*'un fimbrial His-BL0675A tipi proteinleri (B, C, D ve E varyantları arasında) domuz kolonik musinindeki yüzey oligosakkaritlerine güçlü bağlanma afinitesine sahiptir (Sarkar ve ark.,2016).

Yerli faktörler dışında, prebiyotik ve insan sütü oligosakkaritlerinde (HMO) eksojen katkıları ile bakteriyel adezyon ve kolonizasyonda kilit rol oynadığı bildirilmiştir. Prebiyotik ve insan sütü oligosakkaritleri bifidobakteriyel metabolizma için sadece substrat görevi görmezler, aynı zamanda *Bifidobacterium*' un yapışmasını ve etkinliğinde arttırmaktadır. Prebiyotiklerin ekzojen koruyucu etkileri, gastrointestinal sistem içindeki probiyotik hücrelerin hayatta kalma oranını arttırmakta ve bağırsak mikrobiyotasında bulunan diğer türlerle birlikte probiyotik mikroorganizmaların büyümesini ve aktivitesini uyarmaktadır (Sarkar ve ark.,2016).

Bir başka ilginç mekanizma ise bifidobakterilerin insan bağırsak mukozal yüzeyine ekzopolisakkaritler aracılığı ile yapışmasıdır. Bifidobakteri suşları, ekzopolimerik maddeler ile bakterilerini çevreden ayıran bir arayüzey tabakası oluşturlar. EPS, LAB ve Bifidobakteriler de dahil olmak üzere çok sayıda bakteri tarafından üretilir (Sarkar ve ark.,2016).

Probiyotik ürünler piyasaya çıkarılırken ilk karşılaşılan zorluk, mikroorganizmanın GI yolunun fizyolojik koşulları altında yaşayabilirliği ve probiyotik özelliğini muhafaza etmesidir. Bakterilerin suşa özgü canlılığı göz önüne alındığında, EPS tabakasının varlığı, insan bağırsağındaki artmış sağkalımını arttırmaktadır. Çok sayıda doğrudan ve dolaylı deney EPS'nin varlığının safra tuzları ve asitlerinin etkisine karşı bifidobakterilere uzun süreli direnç sağladığını göstermektedir (Alp ve Aslim, 2010, Fanning ve ark., 2012, Sánchez ve ark., 2014, Wickramasinghe ve ark., 2015). EPS

kaynaklı bifidobakterilerin bağırsak epiteline yapışması ile birlikte (Inturri ve ark., 2014, López ve ark., 2012, Ventura ve ark., 2014) patojenlerin inhibisyonunada katkı sağladığına yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Sarkar ve ark.,2016).Ekzopolisakaritlerin probiyotik aktivitesi, hücre lizizinden ziyade patojenlerin hücre bölünmesi sürecine müdahalesine bağlıdır. Bebek dışkısından izole edilen *B. bifidum* PRL2010'un insan bağırsak Caco-2 ve HT-29 hücre mono tabakalarına yapıştığı, böylece patojenik *E. coli* ve *Cronobacter sakazakii*'nin yapışmasını önlediği bildirilmiştir (Serafini ve ark., 2013).

Tablo 4. İnsan deneylerinde etkinlik gösteren *Bifidobacterium* suşlarının etkileri (Hidalgo-Cantabrana ve ark., 2017).

Probiyotik mikroorganizmalar	Etki
• <i>B. breve</i> Yakult + <i>Lb. casei</i> Shirota 88 • <i>B. animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> • <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 + <i>S. thermophilus</i>	• Laktoz intoleranslı hastalarda semptomları iyileştirir • Antibiyotikle ilişkili ishali önlemek - Antibiyotikle ilişkili ishal insidansını azaltın
• VSL # 3 (<i>B. breve</i> + <i>B. infantis</i> + <i>B. longum</i> + <i>S. thermophilus</i> + 1 pound = 0.45 kg. <i>acidophilus</i> + <i>Lb. paracasei</i> + <i>Lb. plantarum</i> + <i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>)	• Antibiyotikle ilişkili ishal insidansını azaltın
• <i>B. bifidum</i> + <i>Lb. acidophilus</i>	• <i>C. difficile</i> ile ilişkili ishali önleme
• <i>B. infantis</i> • <i>B. longum</i> + <i>Lb. acidophilus</i> 102 + <i>Lactococcus lactis</i> + <i>S. thermophilus</i>	• IBS semptomlarını hafifletir
• <i>B. bifidum</i> NCDO 1453 + <i>Lb. acidophilus</i> NCDO1748 147 • İnfloran (<i>B. infantis</i>) + <i>Lb. acidophilus</i>	• Erken doğmuş bebeklerde nekrotizan enterokoliti önleme
• <i>B. bifidum</i> YIT4007	<i>Helicobacter pylori</i> seviyelerini azaltır
• <i>B. Longum</i>	Postoperatif enfeksiyon komplikasyonlarını azaltmak
• <i>B. longum</i> BB536	• Polinozis semptomlarını azaltmak
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 160 • <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019 161 • <i>B. breve</i> BB99 + LAB 162 • <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> AD011 + <i>B. bifidum</i> BGN4	• Egzama insidansını azaltmak
• <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> W52 + <i>B. bifidum</i> W23 • VSL#3	• Yüksek riskli çocuklarda egzama insidansını önleme • Ülseratif kolit hastalarının semptomlarını azaltmak

4.4.7. *Bifidobacterium longum* ' un genel özellikleri

Bifidobakteriler, insan gastrointestinal sistemde (GIT) ve vajinada doğal olarak kolonize olan probiyotiklerdir. *Bifidobacterium longum*, insan vücudundaki en önemli sakinlerden biridir. Bu bakteriler çok faydalı etkilere sahiptir. *B. longum* sindirim sistemini korur, zararlı bakterilerin büyümesini engeller ve ayrıca bağışıklık sistemini güçlendirir (Lee ve ark.,2019). *B. longum* türünde 4 adet alt tür bulunmaktadır, bunlar: *longum*, *infantis*, *suis* ve *suillum* ' dir.

Bifidobacterium longum, diğer *Bifidobacterium* türleriyle birlikte, insan gastrointestinal (GI) yolunu kolonize eder, burada bir bebeğin GI yolundaki bakterilerin% 90'ını temsil etmektedir. Sütten kesildikten sonra, bu sayı bir yetişkinin GI'sinde kademeli olarak% 3'e düşer ve *Bacteroides* ve *Eubacterium* suşları baskın hale gelir (Lee ve ark.,2019).

Bifidobacterium longum gram pozitiü, katalaz negatif, anaerobik, dallı, çubuk şeklinde bir bakteridir. Ayrıca hareketsiz ve spor oluşturmaz. Kolonda, bu bakteriler çok çeşitli şekerleri laktik aside fermente eder buda bağırsaklardaki pH'ı düşürmeye yardımcı olur. *B. longum* genomu, oligosakkaritlerin katabolizması için uzmanlaşmış çeşitli proteinleri kodlar. *B. longum* ' un kolondaki uzun süreli mevcudiyeti, konakçı veya diğer GIT mikroorganizmaları tarafından zayıf bir şekilde sindirilen substratları katabolize etme yeteneğinden kaynaklanmaktadır (Schell ve ark.,2002).

Bifidobacterium longum anne sütü oligosakkaritlerini (HMO) kullanma yeteneğine sahiptir. Emzirilen yenidoğan bebeklerin ilk kolonizasyonu sırasında bifidobakterilere diğer mikroorganizmalara karşı seçici bir avantaj sağladığı ve bu çocuklarda bifidobakterilerin baskınlığından en azından kısmen sorumlu olduğunu düşündürmektedir (Grimm ve ark.,2014).

Bifidobakteriler konakçı kaynaklı m sinleri parçalama ve fermente etme yeteneğine sahiptir. Müsin, goblet hücreleri tarafından salgılanan bağırsak epitelyumu için koruyucu bir tabaka oluşturan yüksek moleküler ağırlıklı glikoproteinlerdir. *B. longum* subsp. *infantis*, suşlarının HMO-bozunma yollarına benzer şekilde, tek karbon kaynağı olarak müsin üzerinde büyüdüğü, m sini parçalayarak enerji kaynağı olarak kullandığı ve müsin yıkımı için ilgili genleri barındırırdığı bildirilmiştir (Grimm ve ark.,2014).

Bifidobacterium longum “antibiyotikle tedavi edilen hastalarda ishalin önlenmesi, kolesterolün azaltılması, laktoz intoleransı semptomlarının hafifletilmesi, bağışıklık uyarımı ve kanserin önlenmesi” vb faydalı etkilere sahip probiyotik mikroorganizmalardandır (Schell ve ark.,2002).

4.4.8. *Bifidobacterium bifidum* ’ un genel  zellikleri

Bifidobacterium bifidum, insanlar da dahil olmak üzere memelilerin vücudunda bulunabilen en yaygın probiyotik bakterilerden biridir. *B. bifidum* hareketli, anaerobik olmayan ve spor oluşturmayan gram-pozitif bir bakteridir. Bakteri gastrointestinal sistemde çubuk şeklinde veya kümeler halinde, çift veya bağımsız olarak yaşamını sürdürebilmektedir (Mitsuoka ve ark.,1990; Palmer ve ark.,2007).

Bifidobacterium bifidum popülasyonunun çoğunluğu kolonda, ince bağırsakta, anne sütünde ve sıklıkla vajinada bulunmaktadır. *B. bifidum*, insan bağırsağında bulunan önemli bir bakteridir. İnsan bağırsağında düşük veya bulunmaması durumunda sağlıksız bir durumun olduğunun göstergesidir. Oral yollarla alınan *B. bifidum* bağırsak florası geliştirmektedir. Ayrıca, oral olarak alınan *B. bifidum*, enterik ve hepatik bozuklukların tedavisi, bağışıklık yanıtının aktive edilmesi ve bazı kanserlerin önlenmesi gibi faydalı etkilere sahiptir (Mitsuoka ve ark.,1990; Palmer ve ark.,2007).

Bifidobacterium bifidum miktarı, insanlarda yaşlandıkça azalmaktadır. *B. bifidum* azaldıkça *Lactobacilli*, *Enterococci*, *Enterobacteria* ve *Clostridia* sınıfı gibi diğer bağırsak bakterileri artmaktadır. Bunların aşırı birikimi ile yaşlı erişkinlerde kanser

riskini arttırır ve karaciğerin yeterli ve etkili bir şekilde işlev görme yeteneğini azaltmaktadır (Mitsuoka ve ark.,1990; Palmer ve ark.,2007).

Pili biyosentezinden sorumlu gen kümeleri, sadece patojenlerde değil, aynı zamanda yararlı bağırsak sakinlerinin de bakteri genomunda tanımlanmıştır. Özellikle, *L. rhamnosus* GG tarafından kodlanan sortaza bağlı piliğin, insan bağırsak hücrelerine yapışma ve immünomodülatör etkileşimler için çok önemli olduğu bildirilmiştir. *B. bifidum* sortaza bağlı pili varlığı ile konağın mukozasındaki biyofilmlerde kalıcı olarak kolonize olabilme, iki bifidobakteri veya bağırsak komensal hücreleriyle fiziksel temasların kurulması vb. için gerekli bir uzantı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *B. bifidum* türleri, kapsüler polisakkarit genleri olmayan tek *Bifidobacterium* taksonudur (Turroni ve ark.,2019).

4.4.9. *Enterococcus faecium* 'un genel özellikleri

Enterokok, normalde insanlar dahil olmak üzere memelilerin bağırsaklarını kolonize eden bir laktik asit bakteri cinsidir. Enterokoklar doğumdan sonraki ilk bakteri kolonizörleri arasındadır. Hem kalın bağırsak hem de ince bağırsakta çoğalabilmektedirler. *Enterococcus* cinsi, *Atopobacter*, *Catelicoccus*, *Melissococcus*, *Pilobacter*, *Tetragenococcus* ve *Vagococcus* cinsleriyle birlikte *Enterococcaceae* ailesine aittir. Genel olarak, enterokoklar, izole koklar şeklinde, çiftler halinde veya kısa zincirler halinde meydana gelmektedir. Spor oluşturmayan, oksidaz negatif ve fakültatif anaerob, gram pozitif, mukusa yapışmayı sağlayan pilileri olan, oksidaz negatif, katalaz negatif ve birincil metabolizmanın ana ürünü (homofermentatif) olarak glikozu laktik aside dönüştürme yeteneğine sahip laktik asit bakterileri (LAB) sınıfında yer almaktadırlar (Devriese ve ark. 2006; Araújo ve ark.,2013; Anagnostopoulos ve ark.,2018).

Cins 20'den fazla tür içermektedir. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*, insan dışkısında bulunan en yaygın enterokok türleridir (Araújo ve ark.,2013; Anagnostopoulos ve ark.,2018).

Bu cinse üye bakteriler 35°C'lik optimum sıcaklıkta büyümektedir, ancak cinsin bazı türleri 10 ila 45°C derece arasındaki sıcaklıklarda büyüebilmekte, bunların çoğu yüksek NaCl konsantrasyonlarında (% 6,5'e kadar), pH 9,6 'da 30 dakika boyunca 60 °C'de hayatta kalabilmekte, bu nedenle termodurik olarak adlandırılmaktadır (Araújo ve ark.,2013).

Bu türlerin safra tuzu hidrolazları ürettikleri, konjüge edilmiş safra tuzlarının daha yüksek bir atılımını teşvik ederek, serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesiyle ilgili potansiyel probiyotik özellikler sundukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Orta ve / veya yüksek asit ve tuz toleranslarından dolayı enterokoklar, eşsiz lezzetlerin oluşumundan ve enterosinlerin üretilmesinden sorumludur. Enterokoklar, organoleptik özelliklere katkıda bulundukları için fermente gıdalara eklenir Ayrıca, enterokokların zeytin fermentasyonu için başlangıç kültürü olarak kullanılması önerilmiştir, bunun sebebi olarak yüksek pH ve tuzluluğa toleranslarından dolayı sürecin ilk aşamasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. El yapımı peynirler, soslar ve diğer fermente ürünler gibi farklı gıdaların doku, lezzet, aroma ve güvenliğine katkıda bulunurlar. Peynir gibi gıda ürünlerinde başlangıç kültürleri, sucukların fermentasyonunda starter kültür , insanlar ve hayvanlar için probiyotikler ve silaj katkı maddeleri olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Araújo ve ark.,2013; Anagnostopoulos ve ark.,2018).

Enterococcus faecium NCIMB 10415, hayvanlar için bir yem katkı maddesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, *E. faecium*'un oral yoldan verilmesinin bağırsak mikroflorasını düzenlediğini ve hayvansal deneylerde bağışıklık fonksiyonunu modüle ettiği gösterilmiştir (Divyashri Ve ark.,2015).

SF68'in insanlarda antibiyotikle ilişkili akut ishali tedavi etme etkinliği gösterilmiştir. Yakın tarihli bir çalışmada, canlı *Bacillus subtilis* ve *E. faecium*'un enterik kaplı kapsüllerinin, makrofajları regüle ederek kolite karşı iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Divyashri Ve ark.,2015).

4.4.10. *Streptococcus thermophilus*’ un genel özellikleri

Streptococcus adı, “bükülmüş meyve” anlamına gelen Yunanca kelimeden türetilmiştir, mikroskop altında bir dizi boncuğa benzeyen zincir olarak görülür. *Streptococcus thermophilus*, aşırı ısı vakalarında hayatta kalabilen bir organizmaya atıfta bulunarak ısı anlamına gelen Yunanca bir terimdir (Sharma ve ark.,2014).

Streptococcus thermophilus, *Streptococcaceae* familyası ve *Lactobacillales* ailesine ait, çiftler halinde veya kısa zincirler halinde oluşan ovoid şekilli hücrelere sahip gram-pozitif, homofermantatif, optimum pH’sı 6.3 olan, spor oluşturmeyen, hem aerobik solunum hem de fermentasyon yoluyla (oksijenin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak) ATP üretebilen bir organizma olan fakültatif anaerop, alfa-hemolitik aktivitesi pozitif, sitokrom, oksidaz ve katalaz negatif bir bakteridir. Optimum büyüme sıcaklığı 35 - 42°C’ derece arasında olup, 42 °C derece gibi yüksek sıcaklıklara karşı toleransa sahip termofilik bir mikroorganizmadır. *S.thermophilus* 1.8 Mb genomu ile diğer laktik asit bakterilerinden ayrılmaktadır (Uriot ve ark.,2017).

Genetik araştırmalar, *S.thermophilus*'un yaklaşık 7000 yıl önce diğer patojenik *Streptococcus* türlerinden ayrıldığını göstermektedir. *S.thermophilus* türlerinin patojenik akrabalarından ayrıldığı, virülanstan sorumlu genlerin çoğunu kaybettiği ve sütte yaşamak için yararlı birçok gen elde ettiği bildirilmiştir. İnsanlar tarafından yüzyıllardır herhangi bir hastalık vermeden tüketildiği için, aynı zamanda Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından Genel Olarak Güvenli Bir Bakteri olarak tanınan tek *Streptococcus* türüdür. *S. thermophilus*, yoğurdun temel başlangıç bakterilerinden biridir. *L.lactis*'ten sonra en önemli ikinci endüstriyel LAB türüdür. *S. thermophilus*'un yoğurt hazırlanmasında geleneksel kullanımının yanı sıra emmental, camembert, brie, mozzarella ve parmesan gibi çeşitli peynir çeşitlerinin üretiminde de kullanıldığı bildirilmiştir (Uriot ve ark.,2017).

Yoğurt üretiminde *S.thermophilus*'un ana rolü laktik asit üretimi ile ilgili asidikasyonun sağlanması, ayrıca fermente ürünlerin aromatik ve dokusal özelliklerine katkıda bulunan formik asit (proteolitik aktivite sağlayan *Lactobacillus*'un büyümesini

destekleyen), asetaldehit (lezzet bileşikleri) veya diasetil gibi ikincil fermentasyon ürünlerinin üretilmesidir (Uriot ve ark.,2017).

Streptococcus thermophilus 'un insan gastrointstinal sistemi geçişi sırasında hayatta kaldığı bildirilmiştir (Uriot ve ark.,2017).

Streptococcus thermophilus'un hücre duvarı, eter bağları ile bağlı olan N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuranik asitten (NAM) oluşur. Bu eşsiz yapı, *S. thermophilus*'un yüksek sıcaklıklara dayanmasına izin verir, bu da daha yüksek sıcaklıklarda süt işleme gerektiren birçok endüstriyel süt fermentasyonu için yararlı etkiler sağlamaktadır (Francesca ve ark.,1990).

Ayrıca, *S. thermophilus* yüzey proteinini eksprese eden psödojenleri içerir (lipoproteinler hariç); patojenik streptokoklar bu yüzey proteinlerini mukozal yüzeylere yapışmak ve konakçı savunma mekanizmalarından kaçınmak için kullanırlar. *S. thermophilus*'un yüzeyinde patojenik streptokokların önemli bir virülans faktörü olan sortaz-bağılantılı yüzey proteinleri mevcut değildir. Gen bölgeleri (epsE, epsF, epsG ve epsI), *S. thermophilus*'ta ekzopolisakkaritin (EPS) sentezlenmesinden sorumludur (Francesca ve ark.,1990).

Tablo 5. İnsan sağlığı için en yararları probiyotik mikroorganizmalar (Fijan.S.,2014; Abatenh ve ark.,2018).

Genus	Species	Probiyotiklerin sağlığa faydaları
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>	Turistik ishalin tedavisi; akut ishalleri çocukların hastanede yatış sürelerinin azaltılması, antifungal aktivite (<i>L. acidophilus</i> ATCC-4495); bakteriyel vajinozisin önlenmesi veya tedavisi; <i>C. difficile</i> ilişkili ishalin tedavisi; çocuklarda ateşli idrar yolu enfeksiyonu insidansının azaltılması; irritabl bağırsak sendromu semptomlarının azalması
	<i>L. rhamnosus</i>	Viral ilişkili akciğer hasarının azaltılması (<i>L. rhamnosus</i> CRL1505); çocuklarda atopik dermatitin şiddetinin önlenmesi ve azaltılması (<i>L. rhamnosus</i>); alerjik hastalık geliştirme riskinin azaltılması (<i>L. rhamnosus</i> GG), (<i>L. rhamnosus</i> HN001; anti-diyabetik potansiyel (insan bebek dışkı örneklerinden çeşitli suşlar); yenidoğanlarda nekrotizan enterokolitin önlenmesi (<i>L. rhamnosus</i> GG); bakteriyel vajinozisin önlenmesi veya tedavisi (<i>L. rhamnosus</i> GR-1); obez kadınların kilo kaybına yardım (<i>L. rhamnosus</i> CGMCC1.3724); akut gastroenterit tedavisi çocuklarda (<i>L. rhamnosus</i> GG); erken doğmuş bebeklerde rinovirüs enfeksiyonları riskinin azaltılması (<i>L. rhamnosus</i> GG ve <i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103); insan kolon kasının lipopolisakkarit kaynaklı hasardan korunması (<i>L. rhamnosus</i> GG)
	<i>L. plantarum</i>	Endotoksin üretiminin önlenmesi, antifungal aktivite (<i>L. plantarum</i> NRRL B-4496), irritabl bağırsak sendromu semptomlarının azalması, Enflamatuar barsak hastalıklarının tedavisinde, toksik şok sendromu hastalığının sağıtımında, kolorektal kanser tedavisinde
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. casei</i>	Yetişkinlerde fonksiyonel kabızlığın tedavisi (<i>L. casei</i> Lcr35 ve <i>L. casei</i> Shirota); <i>C. difficile</i> ile ilişkili ishalin tedavisi; bakteriyel vajinozlu hastanın vajinal florasının restorasyonu (<i>L. casei</i> Lcr35); irritabl bağırsak sendromu semptomlarının azaltılması; geriatric hastalarda antibiyotikle ilişkili ishalin diyare süresinin azaltılması (<i>L. casei</i> Shirota); immünomodulator mekanizmalar (<i>L. casei</i> Shirota); romatoid artrit durumunun iyileştirilmesi (<i>L. casei</i> 01); Salmonella enfeksiyonuna karşı koruma (<i>L. casei</i> CRL-431); Salmonella kaynaklı sinovitin önlenmesi; intravajinal stafilokokların tedavisi (<i>L. casei</i> IMV B-7280).
	<i>L. fermentum</i>	Bakteriyel vajinozisin önlenmesi veya tedavisi (<i>L. fermentum</i> RC-14); patojenik mikroorganizmaların vajinal epitelyuma yapışmasının engellenmesi; antistafilokok etkisi (<i>L. fermentum</i> ATCC 11739); insülin direncini ve hiperkolesterolemiyi azaltma potansiyeli (<i>L. fermentum</i> NCIMB 5221)

Tablo 5. İnsan sağlığı için en yararları probiyotik mikroorganizmalar (Fijan.S.,2014; Abatenh ve ark.,2018).

Bifidobacterium	B. Bifidum	Akut ishalleri çocukların hastanede kalış sürelerinin azaltılması; erken doğmuş bebeklerde nekrotizan enterokolitin azaltılması; toplam kolesterolün azaltılması (<i>B. bifidum</i> MB 109 / DSMZ 23731)
	B. longum	Yenidoğanlarda nekrotizan enterokolitin önlenmesi ve tedavisi; radyasyona bağlı ishalin azaltılması; nekrotizan enterokolitin <i>Bifidobacteria</i> kokteyli ile azaltılması (<i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i>); irritabl bağırsak sendromu semptomlarının azaltılması; gastrointestinal hastalıkların tedavisi (<i>B. longum</i> CMCC P0001); alerjik duyarlılaşma başlangıcına karşı perinatal müdahale (<i>B. longum</i> CCM 7952).
	B. animalis subsp. Lactis	Yetişkinlerde fonksiyonel kabızlığın tedavisi (<i>B. animalis subsp. Lactis</i> DN-173 010); çocuklarda ateşli idrar yolu enfeksiyonu insidansının azaltılması; beyin aktivitesinin modülasyonu; erken doğmuş bebeklerde nekrotizan enterokolitin azaltılması; dental plaktaki toplam mikrobiyal sayımların azaltılması (<i>B. animalis subsp. lactis</i> DN-173 010); toplam kolesterolün azaltılması (<i>B. animalis subsp. lactis</i> MB 202 / DSMZ 23733); üst solunum yolu hastalığı riskinin azaltılması (<i>B. animalis subsp. lactis</i> BI-04).
	B. breve	Yenidoğanlarda nekrotizan enterokolitin önlenmesi ve tedavisi; nekrotizan enterokolitin <i>Bifidobacteria</i> kokteyli ile azaltılması (<i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i>); kolesterolün düşürülmesi (<i>B. breve</i> MB 113 / DSMZ 23732).
Saccharomyce	S. boulardi	Gezinlerin ishali tedavisi; nedeni ne olursa olsun tedavi ve ishal süresinin azaltılması; irritabl bağırsak sendromunun tedavisi; orta derecede ülseratif kolit tedavisi; <i>C. difficile</i> 'nin neden olduğu tekrarlayan psödomembran kolit enfeksiyonunun tedavisi ve azaltılması; çocuklarda akut gastroenterit tedavisi.
Lactococcus	L. lactis subsp. Lactis	Antibiyotikle ilişkili ishalin tedavisi; vajinal epitel hücrelerine yapışma (<i>L. lactis subsp. lactis</i> KLDS4.0325); nisin üretimi (<i>L. lactis subsp. lactis</i> CV56); beyin aktivitesinin modülasyonu; <i>C. difficile</i> 'ye karşı antimikrobiyal aktivite; antimikrobiyal ve probiyotik özellikler (<i>L. lactis subsp. lactis</i> ATCC 11454).
Enterococcus	E. faecium	Antibiyotikle ilişkili ishalin tedavisi; in vitro testlerde <i>Escherichia coli</i> K88 (12) 'ye karşı antagonistik bir etki göstermektedir.
Streptococcus	S. thermophilus	İrritabl bağırsak sendromu semptomlarının azaltılması; yoğurt başlangıç kültürünün antibiyotik direnci; erken doğmuş bebeklerde nekrotizan enterokolitin azaltılması

4.5. Biyofilm

Mikrobiyoloji biliminin ilk ortaya atıldığı dönemlerde mikroorganizmalar karakterize edilirken öncelikle planktonik veya serbest süspanse edilmiş hücreler olduğu ve besin açısından zengin kültür ortamlarında büyüdüğü bildirilmişlerdir. İlk olarak Anton van Leeuwenhoek, basit bir mikroskop ile mikroorganizmaları gözlemlemiş ve tanımlamıştır (Donlan,2002).

Mikroorganizmalar doğal ekosistemlerinde ve canlı hücre dokusunda zararlı veya yararlı bir yaşam sürdürürken, planktonik hücreler halinde yaşamaktansa bir bölgeye yapışıp o bölgede gruplar halinde kolonize olmayı tercih etmekte ve bu doğrultuda evrimleşmektedirler. Bu evrimleşme mikroorganizmalara avantajlar sağlamaktadır. Bunlar; yararlı genlerin ekspresyonunun artması, koloni morfolojisindeki fenotipik değişiklikler, plazmid transferi ile antibiyotik direnç genlerinin elde edilmesi, bol miktarda hücre dışı polimerlerin üretimi, besinlere daha fazla erişim ve hücreler arasında karşılıklı ve sinerjik korumayı kolaylaştıran yakınlık sinyallerini içermektedir (Hall-Stoodley ve ark.,2004).

Biyofilm, mikroorganizmaların kendileri tarafından üretilen hücre dışı polimerik madde matrisi (EPS) içinde, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak o bölgede çoğalıp, topluluk halinde bulunduğu polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır (Donlan, 2002; Bogino ve ark., 2013). Biyofilm oluşumu mikroorganizmaları zararlı koşullardan korumaya yardımcı olur. Hem hayvanlarda, hem insanlarda, hem de bitkilerde (çoğu nemli yüzeylerde, bitki köklerinde) bakteriyel patojenlerin hastalık döngüsünde önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (Bogino ve ark., 2013). Ayrıca biyofilm tabakası nehirler, akarsular, endüstriyel su soğutma tesisleri, atık su arıtma tesisleri, insan vücudunda kontakt lens, kateterler protez, kalp kapakçıkları, böbrek taşı, kalp pilleri, rahim içi araç, diş plaklarında ve akciğer dokusu gibi canlı ve cansız birçok yüzeyde bulunabilmektedir.



Resim 12. Diş plağı, göz kontakt lens ve boru iç yüzeyinde biyofilm yapısı.

(<https://thecapitolhilldentistry.com/dental-plaque-biofilm/>, Erişim tarihi: 23 Şubat 2020).

(<https://www.reviewofcontactlenses.com/article/beware-the-biofilm>, Erişim tarihi: 23 Şubat 2020).

(<https://trenchlesstechnology.com/pipe-cleaning-system-removes-tuberculation-corrosion-biofilms-and-tar-based-liners/>, Erişim tarihi: 23 Şubat 2020).

İnsanlarda, hastane enfeksiyonlarının tahmini olarak % 65'i biyofilm kökenlidir. Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların, meydana getirdiği enfeksiyonları tedavi etmek oldukça güçtür. Bunun en büyük nedenleri arasında konakçı savunmasından kaçmaları ve antimikrobiyallere karşı direnç göstermeleridir (Jamal ve ark.,2015).

4.5.1. Biyofilmlerin bileşimi

Biyofilmlerin oluşmasını sağlayan bileşenler sisteme bağlı olarak değişmektedir. Biyofilm tabakasının ekzopolisakkarit yapısında esas olarak bulunan yapılar; proteinler, DNA veya RNA, polisakkaritler, hücre dışı polimerik maddeler ve bu bileşenlere ek olarak, su biyofilm matrisi içindeki besin akışından sorumlu olan biyofilmin ana parçasıdır. Bu bileşenler bakteri hücrelerini konakçı antibiyotiklerinden, savunma maddelerinden, UV radyasyonundan, pH değişikliklerinden, ozmotik stresten ve kuruma gibi çevresel stres faktörlerinden korumaktadır (Bogino ve ark.,2013).

Tablo 6. Biyofilmin kimyasal bileşimi (Jamal ve ark.,2015).

Biyofilmin yapısında bulunan bileşenler	Matris yüzdesi
Mikrobiyal hücreler	% 2-5
DNA ve RNA	%1-2
Polisakkaritler	%1-2
Proteinler	<% 1-2 (enzimler dahil)
Su	% 97'ye kadar

Biyofilimde yer alan kimyasal bileşenlerden ekzopolisakkarit kuru ağırlığın %50 ila %90'ını oluşturmakta olup biyofilmin birincil matris malzemesi olduğu bildirilmiştir. %10'luk kısmı mikroorganizma topluluğu oluşturmaktadır (Donlan,2002).

Hücre dışı polimerik maddeler esas olarak polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler ve lipitlerdir; biyofilmlerin mekanik stabilitesini sağlarlar, yüzeylere yapışmalarına aracılık ederler ve biyofilm hücrelerini birbirine bağlayan ve geçici olarak immobilize eden uyumlu, üç boyutlu bir polimer ağı oluştururlar. Ek olarak, biyofilm matrisi, hücre dışı enzimleri hücrelere yakın tutarak, çözünmüş, koloidal ve katı biyopolimerleri metabolize etmelerini sağlayarak harici bir sindirim sistemi olarak işlev görür (Flemming ve ark.,2010).

Biyofilmin üç boyutlu mimarisi için iskeleyi oluşturan ve biyofilmdaki yüzeylere yapışmayı ve kohezyonundan sorumlu olan hücre dışı polimerik maddeler (EPS) su geçişine olanak verir ve besinsel maddelerin mikroorganizmalar tarafından absorblanmasını sağlayan “Biyofilm Hücrelerinin Evi” olarak adlandırılmaktadırlar (Flemming ve ark.,2010).

Bakteriyel yüzey bileşenleri ve hücre dışı bileşikler [öncelikle flagella, lipopolisakkaritler (LPS'ler) ve ekzopolisakkaritler (EPS)], bugüne kadar çalışılan çoğu bakteri türünde kombinasyon halinde otoaggregasyon ve biyofilm gelişimi için çok önemlidir. Genel kabul gören biyofilm oluşumu modelinde, çevresel sinyaller

süreci tetikler ve biyofilm topluluğunun yüzeye yaklaşması ve hareket etmesi için kamçı gereklidir (Bogino ve ark.,2013).

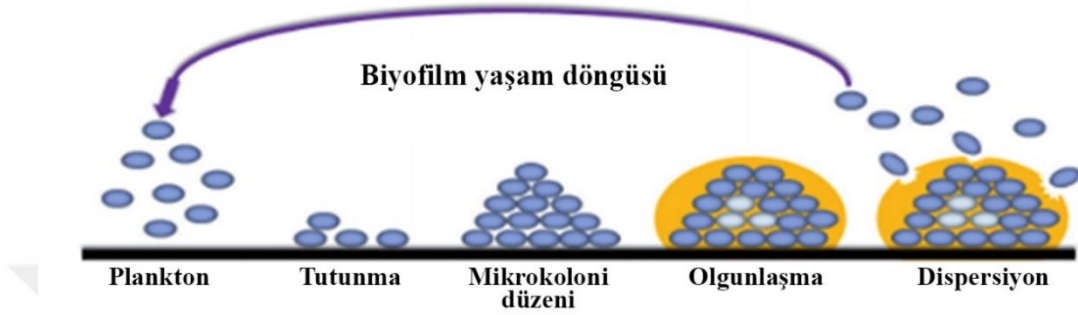
Enzim; Biyofilm matrisi, içeriğinde önemli miktarda protein bulunmaktadır. Biyofilmlerde, biyopolimerlerin parçalanmasında rol oynayan çeşitli hücre dışı enzimler tespit edilmiştir. Ek olarak, bazı enzimler, bakterilerin biyofilmlerden ayrılmasını teşvik etmek için yapısal EPS'nin bozulmasına katılabilir. Diğer enzimler, bulaşıcı süreçler sırasında tıbbi biyofilmlerde virülans faktörleri olarak işlev görür (Flemming ve ark.,2010).

Bakterilerden elde edilen bazı hücre dışı enzimler (ve bazıları mantarlardan) ticari olarak endüstri sanayisinde önemli ölçüde üretilerek fayda sağlamaktadır. Özellikle hücre dışı enzimler topraklarda, çöktirlerde ve suda kendi kendini temizleme süreçlerini yürütür ve bu süreçler, organik maddeleri bozmak için biyofilmlerin matrisinde bulunan hücre dışı enzimleri kullanarak içme suyu ve atık suyun biyolojik arıtımı için benimsenmiş bir yöntem haline gelmiştir. Ayrıca plastikleştiriciler (örneğin tereftalatlar) veya antioksidanlar gibi katkı maddelerinin ayrıştırılması, hücre dışı redoks enzimleri ile mikrobiyal olarak etkilenmiş korozyonda veya polimer omurgasına saldırma yoluyla sentetik polimerlerin ayrıştırılması için de kullanılmaktadır (Flemming ve ark.,2010).

Yapısal proteinler; matris içindeki hücre yüzeyi ile ilişkili ve hücre dışı karbonhidrat bağlayıcı proteinler (lektinler olarak adlandırılır) gibi enzimatik olmayan proteinler, polisakkarit matris ağının oluşumunda ve stabilizasyonunda rol oynar ve bakteriyel yüzey ile hücre dışı EPS arasında bir bağlantı oluşturur (Flemming ve ark.,2010). Son olarak, pili, fimbriae ve flagella gibi proteinli uzantılar biyofilm matrisinin diğer EPS bileşenleri ile etkileşerek yapısal elemanlar olarak işlev görmektedir (Flemming ve ark.,2010).

4.5.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm oluşumu, mikroorganizma hücrelerinin planktonikten sessil büyüme moduna dönüştüğü bir dizi fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktör tarafından yönetilen ardışık, ince düzenlenmiş, çok aşamalı oldukça karmaşık bir süreçtir.



Şekil 3. Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyofilm geliştirme aşamaları. (Santos ve ark.,2018).

Tutunma; Biyofilm oluşumunun ön şartı, bakterilerin bir yüzeye yeterince yaklaşmasıdır. Bakteriler bir yüzeye yaklaştıkça hem çekici hem de itici olmak üzere çeşitli kuvvetler devreye girmektedir. Yüzeyden yaklaşık 10-20 nm mesafede, bakteri yüzeyindeki negatif yükler çoğu çevresel yüzeylerdeki negatif yükler ile itilmektedir. Bununla birlikte, bu itme kuvveti, bakteri hücreleri ve yüzey arasındaki çekici van der Waals kuvvetleri ile yüzeye mekanik bağlantı sağlamak için fimbria ve flagella kullanımı ile aşılabilmektedir. Bir yüzey veya sulu bir ortam (örn., Su, kan) arasındaki katı-sıvı arayüzü, mikroorganizmaların bağlanması ve büyümesi için ideal bir ortam sağlar. Bakterilerin hareket yeteneğinin olması ve yüzey ile arasındaki elektrostatik veya fiziksel çekim bu evrede çok önemlidir. Mikroorganizmalar belirli yüzeylere tutunurken organik ve inorganik maddeleri kullanarak tutunmaya elverişli bir ortam hazırlamaktadırlar. Yüzeyin fizikokimyasal özellikleri bağlanma oranı ve derecesi üzerinde güçlü bir etki sağlamaktadır. Çoğu araştırmacı, mikroorganizmaların plastikler gibi hidrofobik, polar olmayan yüzeylere cam veya metaller gibi hidrofilik malzemelere göre daha hızlı bağlandığını bildirmişlerdir. Mikroorganizmalar uygun ortamı yakaladığında o bölgeye bağlanarak ilk basamağı sağlamaktadırlar. Bağlanma basamağı iki aşamalı bir süreç olarak kategorize edilmektedir bunlar; başlangıçta tersinir bağlanma ve geri döndürülemez bağlanmadır (Sadekuzzaman ve ark.,2015).

Bakteriyel hücrelerin abiyotik veya biyotik bir yüzeye zayıf etkileşimler (van der Waals kuvvetleri gibi) yolu ile geri dönüşümlü olarak bağlanması olayına tersiner bağlanma denir. Bu bağlanma kısa sürelidir ve mikroorganizma kısa sürede uzaklaştırılabilmektedir (Jamal ve ark.,2015).

Geri dönüşümsüz bağlantı çeşitli bağlanma yapıları (flagella, fimbriae, lipopolisakkaritler veya tutunmayı sağlayıcı proteinler) vasıtası ile hidrofilik / hidrofobik etkileşimler yoluyla yüzeye bağlanarak yüzeyden uzaklaştırılması zor bir tutunma şeklidir (Jamal ve ark.,2015).

Mikro Koloni Oluşumu (Çoğalma); Mikro koloni oluşumu, fiziksel yüzeye / biyolojik dokuya, bakteri yapıştıktan sonra gerçekleşir ve bu bağlanma stabil hale gelir ve bu da mikro koloninin oluşumuyla sonuçlanır. Mikrobiyal biyofilm tabakasının oluşması için bakterilerin birbirleriyle haberleşmesi gerekir. Bakteriler “Çoğunluğu algılama ” (QS) sistemini kullanarak çevresinde bulunan bakterinin yoğunluğunu algılar ve ortamda diğer mikroorganizmalarla iletişim kurma amacı ile mesaj verici “oto indükleyici moleküller salgılar. Bu mesajı alan bakteriler o bölgede kolonize olmakta ve sinyal yoğunluğu giderek artmaktadır. Biyofilm tabakasında bakterilerin çoğalması, kimyasal sinyallerin bir sonucu olarak başlar. Ekzopolisakkarit üretiminin genetik mekanizması, sinyalin yoğunluğu belirli bir eşiği geçtiğinde aktive olmaktadır. Bu şekilde bu kimyasal sinyali kullanarak, bakteriyel hücre bölünmeleri gömülü ekzopolisakkarit matrisi içinde gerçekleşir ve bu da mikrokoloni oluşumuyla sonuçlanır (Jamal ve ark.,2015).

Üç Boyutlu Yapı Oluşumu ve Olgunlaşma; Biyofilm’in mikro koloni oluşum aşamasından sonra, biyofilm ile ilgili bazı genlerin ekspresyonu gerçekleşir. Bu gen ürünleri, biyofilm'in ana yapı malzemesi olan EPS için gereklidir. Bakteriyel bağlanmanın kendi başına hücre dışı matris oluşumunu tetikleyebileceği bildirilmektedir. Matris oluşumunu, besin maddelerinin biyofilm içinde taşınması için suyla doldurulmuş kanal oluşumu izler. Araştırmacılar, bu su kanallarının dolaşım sistemleri gibi görev yaptığını, biyolojik besinlerin mikro kolonilerindeki farklı besin maddelerini topluluklara dağıttığını (besin maddesi, oksijen taşınması) ve

topluluklardan atık maddelerin (metabolik atık ürünlerin) uzaklaştırılmasında görev yaptığını bildirerek bunun sonucunda makrokolonizasyonların meydana geldiğini göstermişlerdir (Jamal ve ark.,2015).

Biyofilm Olgunlaşma ve Ayrılma Evresi (Dağılma) ; Biyofilm oluşumundan sonra, araştırmacılar genellikle bakterilerin biyofilmleri düzenli olarak terk ettiğini fark etmişlerdir. Bunu yaparak bakteriler hızlı çoğalmakta ve ortamlara yayılmaktadırlar. Planktonik bakteri hücrelerinin biyofilm tabakasından ayrılması, doğal programlanmış bir ayrışmadır. Bazen bazı mekanik stresler (bazı maddelere gereksinim duydukları için) nedeniyle bakteriler EPS üretimini durdurur ve koloniden çevreye dağılır. Biyofilm hücrelerinin dağılması, ya yeni oluşan hücrelerin büyüyen hücrelerden ayrılması ya da quorum- sensing sistemine bağlı olarak dağılma meydana gelir. Biyofilm tabakasından ayrılmış hücreler, antibiyotik direnç genleri gibi biyofilmin belirli özelliklerini koruma yeteneğine sahiptir. Büyüme sonucu dağılmış olan hücreler yeniden biyofilm oluşturur ve hızla normal planktonik fenotiplerine dönüşebilir (Jamal ve ark.,2015).

4.6. Endüstride Biyofilm Oluşumunun Dezavantajları

Biyofilm oluşumu mikroorganizmalara etkili bir adaptif strateji oluşturur, bu tür davranışlar dört önemli avantaj sağlar: (I) olumsuz çevresel faktörlerden korunma, (II) büyüme için besin maddelerinin kullanılabilirliğinin artırılması, (III) su moleküllerinin bağlanması artırılması, dehidrasyon olasılığının azaltılması, ve (IV) daha yüksek DNA transferi oranlarını kolaylaştıran döl ve diğer bakterilere yakınlığın sağlanması. Tüm bu koşullar bakterilerin hayatta kalmasını artırabilir. Sonuç olarak, bu bakterilerin antibiyotik ve dezenfektan kullanımı gibi geleneksel yöntemlerle inaktivasyonu genellikle etkisizdir (Costerton ve ark. 1999; Donlan, 2002).

Mikroorganizmalardaki hücre dışı matris esas olarak selüloz, proteinler veya ekzojen DNA gibi polisakkaritlerden oluşur. Bu matris sert yüzeylere (gıda endüstrisi ekipmanı, nakliye, dağıtım ve depolama yüzeyleri, toprak vb.) veya biyolojik yapılara (sebze, et, kemikler, meyveler vb.) sabitlenebilir. Hücre dışı matris, bu biyofilmlerin gıda endüstrisindeki güçlü ısrarından sorumlu olan yapısal bir role sahiptir. Besinler ve oksijen difüzyonu bakımından karmaşık gradyanlar üretir, beslenme amaçlı kullanılan hücre dışı enzimler içerir, hücre iletişim moleküllerinin transferine izin verir ve gömülü hücreleri toksik bileşiklere karşı korur. Özetle, biyofilm oluşumu, gıda endüstrisi ortamındaki mikrobiyal hücrelere fiziksel direnç (kurumaya karşı), mekanik direnç (boru hatlarındaki sıvı akışlarına karşı) ve kimyasal koruma (endüstride kullanılan kimyasallara, antimikrobiyallere ve dezenfektanlara) gibi birçok avantaj sağlamaktadır (Galié ve ark.,2018).

Gıda endüstrisi için özellikle önemli olan, gıda fabrikası ortamlarında biyofilm oluşturan bazı türlerin insan patojenleri olmasıdır. Bu patojenler, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan paslanmaz çelik, polietilen, ahşap, cam, polipropilen, kauçuk vb. gibi farklı yapay yüzeyler üzerinde biyofilm yapıları geliştirebilirler (Chmielewski ve Frank, 2003; Abdallah ve diğerleri, 2014; Colagiorgi ve diğerleri, 2017; Galié ve ark.,2018).

Bakterilerin gıda ürününe veya ürünün temas yüzeylerine bağlanması, ciddi hijyen sorunlarına ve gıda bozulmasından kaynaklanan ekonomik kayıplara yol açar. Buna ek olarak, gıda ile temas eden yüzeylerde gıda kaynaklı çeşitli patojenlerin kalıcılığı hakkında bir dizi rapor ortaya çıkmıştır. Bu nedenlerden dolayı, gıda sistemlerinde biyofilmlerin varlığının ciddi bir halk sağlığı riski olduğu düşünülmektedir. Gıda endüstrisinin temel sorunlarından biri, gıda ile temas eden yüzeylerin veya aletlerin yetersiz dezenfeksiyonu nedeniyle gıda kaynaklı patojenik veya bozulma mikroorganizmalarının hayatta kalmasıyla temsil edilir (Carpentier ve Cerf, 1993; Fuster i Valls, 2006).

Bu yüzeylerde oluşan biyofilmler nihai ürünün kontaminasyonunun ana nedenidir. Bu kontaminasyonun sonuçları, ürünün reddedilmesi, ekonomik kayıplar ve hatta gıda kaynaklı patojenlerin oluşturduğu ciddi hastalıklara yol açabilir (Piera Serra, 2003). Gıda matriksleri veya fabrika ekipmanları üzerindeki bakteriyel biyofilmlerle ilişkili gıda kaynaklı hastalıklar zehirlenmeler veya enfeksiyonlar yoluyla ortaya çıkabilir. Örneğin toksinler, gıda işleme tesislerinde bulunan biyofilm tarafından salgılanabilir. Oradan, bir gıda matrisini kirletebilir, bireysel veya çoklu (bir salgın durumunda) zehirlenmelere neden olabilirler (Camargo et al., 2017).

Ek olarak, çiğ et yüzeylerinde ve işleme ortamında (yüzeyler, aletler ve aletler vb.) oluşan biyofilmler de çapraz kontaminasyon ve işlem sonrası kontaminasyon konusunda önemli sorunlar sunmaktadır. Bu nedenlerle biyofilm oluşumunu engellemek amacıyla yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır (Piera Serra, 2003; Fuster i Valls, 2006).

Halk sağlığı ve ürün bozulmasına bağlı sorunlar yaratmanın yanı sıra, biyofilmler mekanik tıkanmalardan ve ısı transfer süreçlerinin empedansından ve yüzeylerin korozyon oranını arttırmaktan sorumludur (Kumar ve Anand, 1998; Chmielewski ve Frank, 2003).

İçme suyu sistemlerinde biyofilm oluşumu boruları tıkalayabilir, hızı ve taşıma kapasitesini azaltabilir, bu da enerji kullanımında artışa neden olmaktadır (Chmielewsky ve Frank, 2003). Isı eşanjörlerinde ve soğutma kulelerinde biyofilm oluşumu da ısı transferini ve verimliliği azaltabilir. Bir işleme tesisinde metal yüzeyler üzerinde oluşan biyofilmlerde bakterilerin yeteneği, bakterilerin asit üretimi nedeniyle yüzeyin korozyonuna neden olabilmektedir (Chmielewski ve Frank, 2003).

Süt endüstrisinde ve diğer gıda endüstrilerinde, ultrafiltrasyon ve ters ozmoz sistemleri, süt ve diğer sıvıların fraksiyonlanması sırasında ve meyve sularının arıtılması sırasında kullanılır. Bu membran filtreler, sürekli olarak gıda ile temas halinde olan çok küçük gözeneklere sahiptir; mikrobiyal eklenti gözenekleri bloke eder ve filtrenin silinmesine neden olur. Bu, akışta bir azalmaya ve bunun sonucunda da kapasite ve ürün kayıplarına neden olur (Piera Serra, 2003). Bakteriyel biyofilmlerin neden olabileceği tehlikeli ve maliyetli hasarın önlenmesi için etkili temizlik prosedürleri gereklidir (Silagyi 2007).

Biyofilmlerin oluşumu için *E. coli*, bağlanmayı başlatmak için flagella, pili ve membran proteinlerini kullanır. Yüzeye tutunduktan sonra kamçısını kaybeder ve hücre dışı polimerik madde üretimini artırır (Gonzalez Ribas, 2005; Houdt ve Michiels, 2005). Çalışmalar, ekzopolisakaritler ve curli biyofilmlerinin artan üretiminin bir sonucu olarak bazı *E. coli* O157: H7 suşlarının gelişebileceğini bildirmiştir (Ryu ve ark., 2004). Ayrıca, bir biyofilm oluşumunun, gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan bir dezenfektan olan hipoklorit çözeltilerine maruz kaldığında *E. coli* O157: H7'ye daha fazla direnç sağladığı gösterilmiştir (Wilks ve diğerleri, 2005; Ryu ve Beuchat, 2005).

Psödomonaslar drenajlar ve zeminler dahil olmak üzere gıda işleme ortamlarında, meyveler, sebzeler, et yüzeyleri ve düşük asitli süt ürünlerinde bulunurlar (Chmielewsky ve Frank, 2003; González Ribas, 2005). *P. aeruginosa*, biyofilmlerin gelişimi ve çekirdek algısı ile regülasyonu için model bir organizma olarak düşünülebilir (Golovlev, 2002). *P. aeruginosa*, biyofilm yapısının stabilitesi için belirleyici olan en az üç polisakkarit (aljinat, Pel ve Psl) üretir. Pel ve Psl biyofilm

gelişimi için birincil yapı iskelesi olarak kullanılabilir ve biyofilm oluşumunun erken aşamalarında yer alır. eDNA, *P. aeruginosa* biyofilm matrisinin önemli bir fonksiyonel bileşenini oluşturur; aslında (i) *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu DNaz ile maruz bırakılarak önlenir; (ii) eDNA'da eksik olan biyofilmlerin deterjan sodyum dodesil sülfata karşı daha duyarlı olduğu gösterilmiştir; (iii) eDNA, uyumlu hücre hizalamalarını koruyarak seğirme hareketliliğine bağlı biyofilm genişlemesini kolaylaştırır; (iv) eDNA'nın, bir hücreden hücreye bağlantı bileşiği olarak *P. aeruginosa* biyofilmlerinin ilk ve erken gelişiminde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür; ve (v) son olarak, eDNA açlık sırasında bakteriler için bir besin kaynağı oluşturur. Bakteriyel motilitelerdeki rollerinin ötesinde, *P. aeruginosa* hücre dışı uzantıları flagella, tip IV pili ve fimbriaları da, hücre-yüzey etkileşimlerinde ve biyofilmlerde mikrokoloni oluşumunda yapışkan olarak rol oynayan matris bileşenleri olarak kabul edilir. D-mannuronik asit ve L-guluronik asitten oluşan doğrusal bir dallanmamış polimer olan aljinat, biyofilmlerin yapısal stabilitesine ve korunmasına ve ayrıca su ve besin maddelerinin tutulmasına katkıda bulunur. *Pseudomonas spp.* alginat sentezleyerek paslanmaz çelik yüzeylere yapışır, bol miktarda EPS üretir ve biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir (Chmielewsky ve Frank, 2003; González Ribas, 2005; Rasamiravaka ve ark.,2015).

Staphylococcus aureus, gıda fabrikaları için önemli bir sorun olan gıda işleyicilerinin mukoza zarlarında ve derisinde çoğalabilir (Giaouris ve diğerleri, 2015), çünkü stafilokokal enterotoksinler ısıya dayanıklıdır ve bu bakterinin bir gıda matrisinde büyümesi sırasında salgılanır. Sonuçta gıda maddesi veya bir hayvan tarafından kontamine olur (Schelin et al., 2017).

Staphylococcus aureus, gıda üretim zinciri boyunca hem biyotik hem de abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturabilir. Bu patojendeki biyofilm oluşumu ve virülansa dahil olan genlerin transkripsiyonu (yüzey proteinleri, proteazlar, kapsüller polisakkaritler), gıda endüstrisinde kullanılan çeşitli yaygın deterjanların öldürücü olmayan konsantrasyonlarının varlığında yukarı regüle edilir (Slany ve ark., 2017). Transkripsiyonel ürünü N-asetilglukozaminiltransferaz, hücre dışı bir polisakarit matrisinin biyosentezinde yer alan *icaA* geninin ifadesi, bu türdeki biyofilm

oluşumunda önemli bir faktördür (Abdallah ve diğerleri, 2015). Bu patojenin biyofilm oluşumunda yer alan diğer genler yapışmada (icaD, cna, fnbA ve fnbB), toksin salgılanmasında (hla ve hlb) ve transkripsiyonel düzenlemede (agr ve sarA) rol oynar (Vergara ve ark., 2017).

Klebsiella pneumoniae biyofilmler oluşturduğu bildirilmiştir. Klinik olarak en önemli *K. pneumoniae* biyofilmleri, kateterlerin ve diğer kalıcı cihazların iç yüzeylerinde oluşanlardır (Piperaki ve ark.,2017).

Wu ve ark. (2011), treC ve sugE genlerinin kapsüler polisakkarit üretimini modüle ederek biyofilmi etkilediğini ve treC'nin gastrointestinal sistem kolonizasyonunu kolaylaştırdığını ve *K. pneumoniae* enfeksiyonunun oluşumuna ve kalıcılığına katkıda bulunduğunu bildirmiştir.

Katı yüzeyler üzerinde *K. pneumoniae* biyofilmlerinin gelişimi hücre yapışmasından mikrokolonilerin oluşumuna, olgunlaşmasının ve son olarak serbest yaşayan hücrelerin dağılmasına kadar ilerler. Formasyon sürecine dahil olan en önemli yüzey yapıları tip 3 fimbria ve CP.14 fimbriae kararlı yapışmaya aracılık ederken, CP'ler sonuçta hücre-hücre iletişimini ve biyofilm mimarisini etkiler. Biyofilm üretiminin dinamik süreci ve çevresel uyaranların değişkenliği göz önüne alındığında, gömülü hücreler gen ekspresyonunda hızlı ve kapsamlı değişiklikler yapabilmelidir (Piperaki ve ark.,2017).

4.7. Endüstride Biyofilm Oluşumunun Avantajları

Bir biyofilmin oluşumu ve gelişimi, bakteri suşu, yüzeyin özellikleri, pH, besin konsantrasyonu ve sıcaklık gibi çevresel parametreler dahil olmak üzere birçok faktörden etkilenmektedir. Probiyotikler genellikle biyofilm olarak bilinen ve farklı abiyotik veya biyotik faktörlerle karşılaşan bir mikrobiyal popülasyonun gelişimi için, faydalı özelliklere sahip kompleks topluluklar oluşturur (Costerton ve ark.,1999). Biyofilm tabakası kolonizasyon için bakterilerin bağırsak mukozası gibi belirli bir epitelyuma yapışmasını sağlayan, epitelde kalış sürelerini uzatıp stabilize etmesini yardımcı olan, ayrıca patojenik bakterilerle rekabete girerek o bölgede kolonize olmalarını engelleyen ve antimikrobiyal maddeleri ile inhibe ederek tutunmalarına engel olan bazı önemli faktörlere sahiptir (Saxelin ve ark.,2005; Salas-Jara ve ark.,2016).

Biyofilmlerin temel özelliği, antibiyotiklere ve enzimlere karşı koruma sağlamaya yardımcı olan ve popülasyonun metabolik etkileşimi için bir mikro ortam oluşumunu destekleyen hücre dışı bir polisakkarit matrisinin oluşmasıdır. Olgun bir biyofilmin yeni oluşan biyofilmden daha fazla antibakteriyel aktivite gösterdiği ve gastrik pH toleransının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Phillips ve ark.,2015).

Biyofilmler, toksik bileşiklere yüksek direnç sağlayan, yüksek stabilite ile sürekli süreci kolaylaştıran uzun süreli aktivite sağlayan EPS içindeki yüksek biyokütle konsantrasyonu ile kendi kendine immobilizasyonlarından dolayı biyoteknoloji endüstrilerinde büyük faydalar sağlamaktadır. Biyofilmler gıda sektöründe organik asitler (asetik asit, laktik asit, süksinik asit ve fumarik asit), polisakkaritler, etanoller, butanollerin üretiminde kullanılmaktadır (Todhanakasem.,2013).

Araştırmalara göre biyofilm oluşumu tipik olarak gıda endüstrisinde, özellikle Akdeniz ülkeleri için ekonomik ve besin kaynağı olan sofralık zeytinlerin fermantasyonunda kullanılan güzel bir örnektir. Zeytin meyvesinin derisinde "özellikle doğal olarak fermente olmasını sağlayan probiyotik mikroorganizmalar" biyofilm oluşturmaktadır. Bu bakteri ve maya suşları zeytinin fermantasyonunda rol oynar. Ayrıca meyvede baskın bir tat oluşturarak ve zeytinin gram negatif bakterilerin

neden olduğu mikrobiyal bozulmaları önleyerek etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu bağlamda sofralık zeytinin kalitesi ve güvenliği ile son ürünün tadı ve aroması, meyvenin mezokarpında bulunan biyofilm oluşturan mikroorganizmalar tarafından belirlenmiştir. Ayrıca, biyofilm oluşturma yeteneği fermente meyve ürünlerinin arzu edilen özelliğe kavuşmasını sağlamaktadır (Gulgor ve ark.,2016).

Gıda endüstrisinde, özellikle laktik asit bakterileri fermente ürünlerde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle laktik asit bakterileri arasında dirençli suşların seçilmesi, ekonomik kaybın önlenmesi ve aynı zamanda dönem boyunca hızlı büyüme ve fermantasyonun teşvik edilmesi için büyük bir öneme sahiptir. Dirençli suşlar fermantasyon işleminde değerlidir. Laktik asit bakterileri arasında, insan sağlığına faydaları nedeniyle gıda endüstrisinde probiyotik türler dikkat çekmektedir. Bu bağlamda, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip probiyotik mikroorganizmaların arzu edilen etkileri sıcaklık, gastrik pH ve bazı mekanik kuvvetlere karşı artan dirençtir ve bu özellikleri planktonik muadillerinde gözlenememiştir (Gulgor ve ark.,2016).

Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* ve diğeri probiyotik mikroorganizmalar biyofilm oluşturma yeteneğine sahip, teknolojik ve endüstriyel önemleri olan suşlar arasında yer almaktadır (Gulgor ve ark.,2016).

Lactobacillus' un abiyotik yüzeylerde (cam veya polistiren) biyofilm oluşturma kapasitesi son yıllarda incelenmiştir ve sonuçlar sadece bazı suşların bu özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Bazı biyofilm oluşturan suşlar tarafından üretilen EPS'nin, bazı patojenik bakteriler tarafından biyofilm oluşumunu engelleyebildiği de yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Terraf ve ark.,2012; Salas-Jara ve ark.,2016).

Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC 53103) klinik olarak incelenen faydalı etkileriyle en çok tercih edilen probiyotik mikroorganizmalardan biridir. Bu tür insan bağırsak mukozasına yapışabilir ve sağlıklı yetişkinler tarafından ağızdan alındıktan sonra bir haftadan daha uzun sürelerde yaşamına devam edebilmektedir (Alander ve ark.,1999; Salas-Jara ve ark.,2016). Aynı zamanda, kullanılan kültür ortamından ve düşük pH, yüksek ozmolarite veya safra, müsin varlığı gibi gastrointestinal ortamlarla

ilişkili koşullardan güçlü bir şekilde etkilenen bir abiyotik yüzeyde (polistiren) in vitro olarak biyofilmler oluşturduğu bildirilmiştir. Örneğin, müsin varlığı biyofilm oluşturma kapasitesini % 20 oranında artırır. Buna karşın, düşük bir pH biyofilm oluşturma kapasitesini azalttığı bildirilmiştir (Lebeer ve ark.,2007).

Lactobacillus rhamnosus suşları polistiren yüzeyler üzerinde, MRS ortamında biyofilm oluşturmak için güçlü bir kapasite göstermiştir ve biyofilm tabakası *Escherichia coli* ve *Salmonella spp.* gibi patojenik bakterileri güçlü bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir (Bujnakova ve ark.,2012).

Lactobacillus rhamnosus matrisi polisakkaritlerin ve proteinlerin bir karışımı olduğunu ve genel olarak enzimatik bozunmaya karşı daha dirençli olduğunu ortaya koydu. Ek olarak, matris, (i) yabancı bileşiklerin konakçıdan difüzyonuna karşı fiziksel bir engel ve ayrıca (ii) çevresel stres faktörlerine karşı koruma sağlar. Kristal mor deneyi ile yapılan çalışmada vajinal izolattan izole edilen, *Lactobacillus reuteri* ve *Lactobacillus rhamnosus*' un biyofilm oluşumuna yönelik araştırmada, 72 saatte maksimum biyokütle yoğunluğuna ulaştığını ve biyofilm oluşumunun mukozal kolonizasyonunu ve kalıcılığını arttırdığını ayrıca epitelyal hücre reseptörlerini maskeleyerek, böylece patojenlerin mukozal reseptörlere yapışmasını engelleyerek etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Leccese ve ark.,2016; Stanbro ve ark.,2016).

Biyofilm oluşturma kapasitesi nedeniyle yaygın olarak incelenen bir başka *Lactobacillus* türü *L. plantarum*'un MRS broth içinde biyofilm oluşturabildiğini ve planktonik bakterilere göre biyofilm durumunda asetik asit, sodyum hipoklorite ve etanole daha dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir (Salas-Jara ve ark.,2016; Kubota ve ark., 2008).

Lactobacillus plantarum' da, bağırsağa kolonize etme yeteneğinde bir mannoz spesifik adezinin rol oynadığını bildirmişlerdir. *Lactobacillus plantarum*'dan elde edilen EPS matrisinin karakterizasyonunda, çeşitli oranlarda mannoz, fruktoz, galaktoz ve glikozdan oluşan polisakkarit açısından zengin bir polimer ortaya çıkmıştır. Safılaştırılmış matriks 283.5⁰C'ye kadar termal direnç sergilediği ve bakteriyel

patojenleri ve kolon kanseri hücrelerini inhibe ettitiği bildirilmiştir (Adlerberth ve ark. 1996; Stanbro ve ark.,2016).

Aoudia ve ark., (2016), farklı probiyotik türlerin biyofilm oluşturma kapasitesini araştırmış. *L.plantarum* ve *L.fermentum* suşlarının abiyotik yüzeylerde biyofilm olarak büyüebildiklerini, ancak biyokütle yoğunluğunun her iki suş arasında farklı olduğunu bildirmişlerdir.

Han ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus kefir*' nin biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Ruas-Madiedo ve ark., (2007) benzer şekilde safra tuzlarıyla takviye edilmiş ortamlarda büyütüldüğünde bakteriyel biyofilmlerin önemli bir bileşeni olan hücre dışı polimerik maddelerin (EPS) sentezinde artış görülmüştür. *Bifidobacterium*'un toksinlere ve çevresel strese karşı bir savunma biçimi olarak EPS ürettiğini bildirmiştir.

Turroni ve ark., (2013) fibronektin ve laminin gibi hücre dışı glikoproteinlere yapışmayı sağlayan *Bifidobacterium*' un nisin ile indüklenebilir pilusa sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu pilus ayrıca bakteriyel biyofilmlerin güçlü bir öncüsü olan bakteri topluluğunun arttırılmasını sağlamakta ve hareket yeteneğine katkıda bulunmaktadır. *Bifidobacterium bifidum* PRL2010'un hücre dışı matris proteini ve bakteriyel pilusu yapışmayı sağlayan en önemli faktörlerdendir.

Enterococcus faecium'un bakteri mukozasına yapışmasını sağlayan, kolonizasyonunda görev alan ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunan hücre duvarı ile ilişkili proteinlerin olduğu bildirilmiştir. Agg geni tarafından kodlanan agregasyon maddesi, bakteriyel konjugasyonda ve plazmid transferinin kolaylaştırılmasında ve ayrıca bir dizi ökaryotik yüzeye yapışmada yer alan feromon ile indüklenebilir bir yüzey glikoproteinidir (Popović ve ark.,2018).

Mikrobiyal biyofilm oluşumunun genel olarak patojen mikroorganizma virülansı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Öte yandan, biyofilm oluşumu gıda endüstrisinde, sanayi

endüstrisinde bazı durumlarda istenen bir özellik olabilmektedir. Özellikle biyofilm tabakası ile metan gazı üretilmekte, su kalitesi geliştirilmekte, oksijen ihtiyacını biyokimyasal olarak karşılayabilmekte, butanol üretimi, asetik asit / sirke üretimi yenilenebilir enerji üretimini sağlama ve mikro kirlilik öğelerini geri dönüştürebilme yetenekleri sayesinde ekolojik açıdan değerlendirilebilir nitelikte olmaktadırlar (Qureshi ve ark.,2005; Maegaard ve ark.,2019; Zhong ve ark.,2019; Sun ve ark.,2019).



5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Bitki ekstreleri ve saf fenolik bileşikler

Satureja cuneifolia ve *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii* bitkileri Dr. Turgut Taşkın tarafından toplandı ve Dr. İsmail Şenkardeş tarafından teşhis edildi. Teşhis edilen numuneler sırasıyla MARE:18815 ve MARE:18074 kodları ile Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklandı. Çalışmada kullanılacak saf bileşiklerden Tannik asit ve Rosmarinik asit Farmakognozi Anabilim Dalından temin edilmiştir. Malik asit, Kaempferol ve p-Kumarik asit Sigma Aldrich ve Cayman firmasından satın alınarak kullanıldı (Tablo 7).

Tablo 7. Çalışmamızda kullanılan bitki kaynakları, bitki ekstreleri ve saf fenolik bileşikler

Bitki Kaynakları	Bitki Ekstreleri ve Saf Fenolik Bileşikler
1.Doğal kaynaklı bitkiler	<i>Thymus praecox</i> subsp. <i>skorpilii</i> var. <i>skorplii</i>
2.Doğal kaynaklı bitkiler	<i>Satureja cuneifolia</i>
3.Sentetik kaynaklı bitkiler	Rosmarinik asit
4.Sentetik kaynaklı bitkiler	Tannik asit
5.Sentetik kaynaklı bitkiler	Malik asit
6.Sentetik kaynaklı bitkiler	Kaempferol
7.Sentetik kaynaklı bitkiler	p-Kumarik asit

5.1.2. Bitki ekstrelerinin hazırlanması

Dr. Turgut Taşkın tarafından bitkilerin topraküstü kısımları oda şartlarında kurutuldu. Kurutulan kısımlar bitki öğütücüsü (Renas, RBT1250) kullanılarak toz edilmiştir. Toz edilen numunelerden maserasyon yöntemi kullanılarak metanol çözücüsü ile tüketme yapılmıştır. Tüketme yöntemi ile elde edilen organik çözücüler rota evaporatörde 50°C'yi aşmayan sıcaklıkta uçurulup ham ekstreler elde edilmiş ve ekstreler çalışmaya başlanılacağı güne kadar buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilmiş ve deney sırasında uygun çözücülerde çözdürülerek kullanılmıştır.

5.1.3. Mikroorganizmalar

Çalışmamızda yer alan klinik mikroorganizmalar Anabilim Dalımızda daha evvel yapılan bir tez çalışmasından (Dr.Öğr.Üyesi. Pervin Rayaman danışmanlığında 2016 yılında tamamlanan Özge Sinem Aytaç'ın “Çamaşır Deterjanlarının Antimikrobiyal Etkinliği” başlıklı Yüksek Lisans Tezinin deneysel aşamasında izole edilen stoktan temin edilmiştir. Bu mikroorganizmalar T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Kamu Hastaneler Kurumu İstanbul Anadolu Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ve matriks yardımıyla lazer iyonizasyon kütle spektrometresi (MALDI-TOF) ile tanımlanmış çeşitli klinik suşlardan (MRSA) Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (kandan), *Escherichia coli* (idrardan), *Pseudomonas aeruginosa* (yaradan), *Klebsiella pneumoniae* (trakial aspirattan), *Salmonella typhimurium* (dışkıdan) elde edilmiştir. Çalışmamızda standart suşlardan *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 yer alan mikroorganizmalar Anabilim Dalımızın kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan probiyotik mikroorganizmalar Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/ Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Araştırmada probiyotik ürün ve preparatlardan izole edilen probiyotik mikroorganizmalar 2017 yılında tamamlanan Nurten Tetik'in “Probiyotik Ürün ve Preparatların *Helicobacter pylori* ve *Staphylococcus aureus* Üzerine Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması” Başlıklı Yüksek Lisans Tezinin deneysel aşamasında izole edilen stoktan temin edilmiştir. *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kefir*, *Bifidobacterium spp.* ve standart probiyotik mikroorganizmalar *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 probiyotik kültürler kullanıldı.

Tablo 8. Çalışmamızda yer alan klinik ve standart suşlar

Klinik suşlar	Standart suşlar
Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) (kandan)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300
<i>Escherichia coli</i> (idrardan)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (yaradan)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (trakeal aspirattan)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352
<i>Salmonella typhimurium</i> (dışkıdan)	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028

Tablo 9. Çalışmamızda yer alan probiyotik mikroorganizmalar

Probiyotik ürün ve preparatlardan izole edilen probiyotik mikroorganizmalar	Standart probiyotik mikroorganizmalar
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (P2.firmasıpreparatı)	<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931
<i>Enterococcus faecium</i> (Ev peynir suyu)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356
<i>Lactobacillus plantarum</i> (Ev peynir suyu)	<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258
<i>Lactobacillus kefir</i> (Ev kefir)	<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521
<i>Bifidobacterium spp</i> (T4. Firması sade kefir)	<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707

5.1.4. Kimyasal maddeler ve ekipmanlar

Araştırmada kullanılan bazı sarf malzemeler SAG-C-YLP-170419-0151 nolu proje desteğiyle ve Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Farmakognozi Anabilim Dalı ve Eczacılık Fakültesi ARGE laboratuvarının olanakları ile temin edilmiştir.

Petri Kutusu	Gosselin
Mueller Hinton Agar	Lab M
Tryptone Soy Broth	Lab M

Tryptone Soy Agar	Lab M
M.R.S. Agar.	Lab M
M.R.S. Broth	Lab M
Meropenem	Liofilchem
Rosmarinik Asit)	CAYMAN
Malik Asit	SIGMA
p-Kumarik Asit	SIGMA
Kaempferol	CAYMAN
Kaba terazi	Kern
Hassas terazi	Precisa XB220A
Derin dondurucu	Beko D9459NM
Önkübatör	Binder BD 115
Laminar flow	Esco Class II Type A2
Otoklav Hirayama HV-50L	Hirayama HV-50L
Vortex	IK Minishaker
Pastör fırını	Electro-Mag
Pastör fırını	Electro-Mag
Distile su cihazı	GFL
Dondurucu -80	ARCTIKO
UV-Visible Spektrofotometre	HELİGOS
Soğutmalı santrifüj	Beckman
Mikroplak okuyucu	Epoch
Çok Kanallı Mikropipet	BRAND Marka 8' li Otomatik Pipet 20- 200 Uİ
Multiple Well Cluster Plate, 96	Corning
Su banyosu	Nüve ST 402

Serum fizyolojik hazırlanışı

Serum fizyolojik hazırlanırken 9 gr NaCl, 1 litre distile suda çözülerek hazırlandı. Tüplere paylaştırılarak otoklavda 15 dakika 121 °C’ de steril edildi. İnokulum süspansiyonunun hazırlanmasında kullanıldı.

PBS' nin hazırlanışı

Fosfat tamponlu salinin birçok kullanımı vardır, çünkü izotoniktir ve çoğu hücre için toksik etkisi bulunmamaktadır. 1,15 gram (Na_2HPO_4), 0,23 gram (NaH_2PO_4) ve 9 g (NaCl) tartılır. 900 ml distile suda çözdürüldü ve pH' ı 7,3'e ayarlandı ve çözelti 1 L'lik hacime tamamlandı. İstenilen hacimlerde şişelere bölünerek. Daha sonra da otoklavda 121 °C’de, 1 atmosfer basınç altında, 15 dakika tutularak steril edildi. Kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra oda ısısında saklanarak deney sırasında kullanıldı (Uysal, 2011).

5.2. Yöntem

5.2.1. Bakteri suşlarının aktiveştirilmesi

Çalışmada kullanılan tüm test bakterileri uygun sıvı besiyeri ve sıcaklıkta 24- 72 saat inkübe edilerek aktiveştirildi (Ghaffari, 2013). Çalışmada kullanılmış olan patojen mikroorganizmalar TSB besiyerinde 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılarak aktiveştirildi. Probiyotik mikroorganizmalar MRS broth besiyerinde $37 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de 24-72 saat süreyle aktiveştirildi. *Bifidobacterium* spp, *B.longum*, *B.bifidum*, *L. rhamnosus* Anaerob jar içerisinde $37 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de 72 saat inkübe edilmiş olup bu mikroorganizmaların yer aldığı tüm deneylerde ortama % 10 CO_2 salınımını sağlayan AnaeroPackler kullanılarak anaerobik ortam oluşturuldu.

Tablo 10 . Çalışmamızda kullanılmış mikroorganizmaların inkübasyon süresi ve üreme ortamları

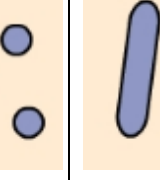
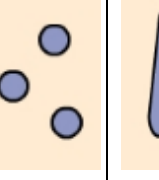
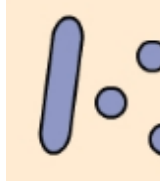
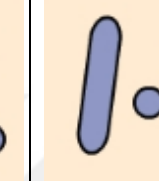
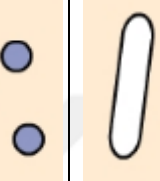
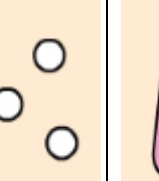
Suşlar	İnkübasyon Süresi	Aerop/Anaerop Ortam
(MRSA) (kandan)	24 saat	Aerop
<i>Escherichia coli</i> (idrardan)	24 saat	Aerop
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (yaradan)	24 saat	Aerop
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (trakial aspirattan)	24 saat	Aerop
<i>Salmonella typhimurium</i> (dışkıdan)	24 saat	Aerop
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	24 saat	Aerop
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	24 saat	Aerop
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	24 saat	Aerop
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	24 saat	Aerop
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	24 saat	Aerop
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (P1.firması preparatı)	24-48 saat	Anaerop
<i>Enterococcus faecium</i> (Ev peynir suyu)	24-48 saat	Aerop
<i>Lactobacillus plantarum</i> (Ev peynir suyu)	24-48 saat	Aerop
<i>Lactobacillus kefir</i> (Ev kefir)	24-48 saat	Aerop
<i>Bifidobacterium spp.</i>	72 saat	Anaerop
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	24-48 saat	Aerop
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	24-48 saat	Aerop
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258	24-48 saat	Aerop
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521	72 saat	Anaerop
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	72 saat	Anaerop

5. 2.2. Gram boyama

1884 yılında Danimarkalı bilim adamı Hans Christian Gram tarafından oluşturulan gram boyama, bakteri türlerini hücre duvarlarının kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre iki büyük gruba (Gram pozitif ve Gram negatif) ayırmak için kullanılan ampirik bir yöntemdir.

İzolatların Gram boyanma özelliklerinin tespiti için; öze yardımı ile katı besiyerden örnek alındı, aseptik şartlarda fizyolojik tuzlu su (FTS) damlatılmış lam üzerinde süspanse edilerek lam yüzeyine yayıldı. Lam önce havada kurutulup, sonra bek alevinden 3 kez geçirilerek tespit edildi. Daha sonra preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatılıp 2 dakika beklendi ve su ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırıldı. Preparatın üzerine, lugol çözeltisi damlatılarak 2 dakika bekletilip, su ile yıkanarak lugol çözeltisi uzaklaştırıldı. Daha sonra % 96' lık etil alkol çözeltisi damlatılarak 30 saniye renksizleştirme işlemi yapıldı. Ardından su ile yıkanarak zıt boya olarak sulu fuksin damlatıldı ve 1 dakika bekletildikten sonra preparat tekrar su ile yıkanarak havada kendi halinde kurumaya bırakıldı. En son olarak preparata immersiyon yağı damlatılarak 100' luk objektifte incelendi. Mor renkli olan bakteriler Gram (+), pembe renkli olan bakteriler ise Gram (-) olarak değerlendirildi (Tunalı, 2014; Harrigan ve McCance 1966).

Tablo 11. Gram Boyama işleminin her adımında meydana gelen renk değişiklikleri

Reaktif	Isıyla sabitlenmiş hücreler	Kristal viyole (2 dakika)	Lugol (2 dakika)	% 96 lik Alkol (30 saniye)	Sulu fuksin (1 dakika)
Gram pozitif					
Gram negatif					

5.2.3. Antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi

5.2.3.1. Besiyerlerinin hazırlanması

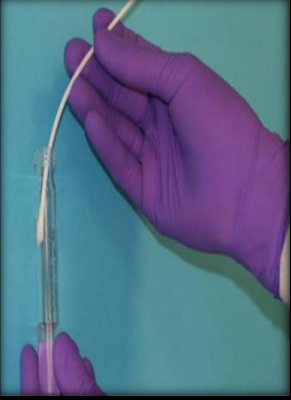
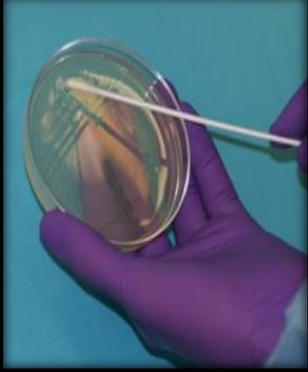
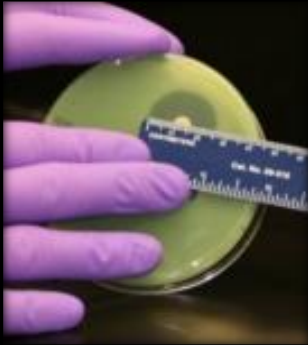
Çalışmada Müeller-Hinton Agar ve MRSA Agar'dan belirli oranlarda besiyerleri tartılarak distile su içinde çözdürülerek hazırlanıp steril edilmişti. Sterilizasyon 121⁰ C basınçta 15 dakika süreyle yapıldı. Daha sonra % 0,9'luk NaCl çözeltisine öze yardımıyla alınarak bakteri bulanıklığı 0.5 McFarland' a (1×10^8 kob/ml) ayarlandı.

5.2.3.1.2. Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite deneyleri için hazırlanması

Antimikrobiyal aktivite tayini için artan polariteye göre elde edilmiş olan etanol ve dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde farklı konsantrasyonu olacak şekilde çözülerek steril tüplere aktarılarak kullanıldı.

5.2.3.1.3. Disk difüzyon testi

Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği ile CLSI doküman M07-A9 önerileri dikkate alınarak, çalışmamızda yer alan 7 adet bitkisel ajanın (2'si bitki türünden elde edilen bitki ekstraktları ve ticari firmalardan satın alınan saf fenolik bileşiklerin) patojen suşlara karşı antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) standartlarına göre yapıldı. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda doğrudan koloni süspansiyonu yöntemini kullanarak organizmanın 18-24 saatlik agar plağındaki tek düşmüş kolonilerden serum fizyolojik içerisinde McFarland 0,5 bulanıklık (1×10^8 kob/ml) standardına eşdeğer süspansiyon yapılarak inokülum hazırlandı. İnokülum süspansiyonunun bulanıklığı ayarlandıktan sonra süspansiyondan 0,1 ml alınarak steril bir eküvyon yardımıyla MHA yüzeyine inoküle edildi. Daha sonra 20 µL bitki ekstraktları ve saf fenolik bileşiklerin emdirilmiş olduğu disklerle (disk çapı 6 mm) steril bir pens yardımı ile agar yüzeyine yerleştirildi. Besiyerleri bakteriler için 24 saat süre ile 37°C'de inkübe edilmiş ve oluşan inhibisyon zonlarının çapı elektronik kumpas yardımı ile ölçüldü. Probiyotik mikroorganizmalar için besiyeri olarak MRS Agar ve 48-72 saatlik agar plağına tek düşmüş koloniler kullanıldı. Yöntemin pozitif kontrolü için antibakteriyel etkinlik testinde meropenem (10 µg/disk) diski kullanıldı. Tüm deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi (CLSI, 2012; Uysal, 2011; Hudzicki, 2018).

Numuneden örnek alınır.	McFarland 0,5 ayarlanır.	Örnek besiyerine yayılır.
		
Diskler pens ile alınır.	Besiyerine aktarılır.	Zon çapları ölçülür.
		

Şekil 4. Disk difüzyon metodu (Hudzicki.,2018).

5.2.3.1.4. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Değerinin Saptanması:

Çalışmamızda bazı bitki ekstraktları ile fenolik saf bileşiklerin patojen ve probiyotik mikroorganizmalar üzerine minimum inhibitör konsantrasyon değerinin tespiti Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) direktiflerine uygun olarak, sıvı mikrodilüsyon testi ile yapıldı (CLSI, 2012).

Kasyon ayarlı MHB besiyerinin hazırlanması;

Besiyerlerinin kasyon ayarı için kalsiyum (Ca) ve magnezyum (Mg) stok çözeltileri hazırlandı.

Kalsiyum stok çözeltisinin hazırlanması;

Burada 3,68 gram $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ maddesi tarttık üzerine 100 mL distile su ekleyerek çözdürüldü. 10 mg/mL Ca^{++} iyonu içeren bir çözelti elde edildi. Bu çözeltiyi membran filtreden geçirerek steril edildi.

Besiyerinde olması istenen Mg^{++} iyon miktarı 10 12,5 mg/mL'dir.

Ca^{++} iyon miktarı 20-25mg/mL'dir.

Bu iyon miktarlarını sağlamak için 100 ml MHB besiyerine Mg^{++} stok çözeltisinden 0,11 mL, Ca^{++} Stok çözeltisinden 0,21 mL ilave edildi.

<http://www.dilaco.com/img/presentaciones/212322.pdf> Erişim Tarihi: 11.04.2020

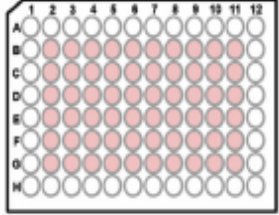
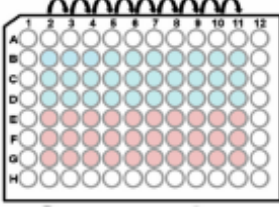
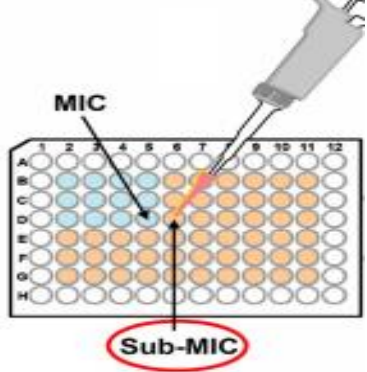
Magnezyum stok çözeltisinin hazırlanması;

Burada 8,36 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ maddesi tartıldı ve üzerine 100 mL distile su ekleyerek çözdürüldü. Daha sonra 10 mg/mL Mg^{++} iyonu içeren bir çözelti elde edildi. Bu çözeltiyi membran filtreden geçirerek steril edildi.

<http://www.dilaco.com/img/presentaciones/212322.pdf>, Erişim Tarihi: 11.04.2020

5.2.3.1.4.1. Mikrodilüsyon testi

Antibakteriyel etkinlik testinde Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda doğrudan koloni süspansiyonu yöntemini kullanarak organizmanın 24 saatlik Muller Hinton Agar (MHA) plağından tek düşmüş koloniler alınarak, serum fizyolojik tuzlu su içerisinde McFarland 0.5 bulanıklık (1×10^8 kob/ml) standardına göre süspansiyonlar hazırlandı. Bitki ekstraktları ve saf fenolik bileşikler kendi çözücülerinde çözülürölerek uygun konsantrasyonlarda hazırlandı (Malik asit 0,7 g/1 mL-Çözücü: Etanol (%96), p-Kumarik asit 0,1 g/1 mL-Çözücü: Etanol(%96), Tannik asit 0,33 g/1 mL-Çözücü: Etanol (%96), Kaemferol 0,017 g/1 mL-Çözücü: DMSO, Rosmarinik asit 0,2 g/1 mL-Çözücü: DMSO, TPS 0,16 g/1 mL-Çözücü: DMSO, *Satureja cuneifolia*-0,16 g/1 mL-Çözücü: DMSO). Mikroplakların her bir kuyucuğına 100 µl Katyon Ayarlı MHB (KAMHB) besiyeri eklendi. Ardından test edilecek örneklerden alınarak ilk kuyucuğına 100 µL konulup bitki ekstraktları ve saf fenolik bileşiklerin ikişer kat azalan seri seyreltileri yapılarak 12. kuyucuktan 100 µL dışarı atıldı. En son FTS içerisinde seyreltilmiş McFarland 0,5 bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonu 1:10 oranında seyreltilerek, 10^7 kob /ml inokulum yoğunluğu elde edildi. Hazırlanan bakteri süspansiyonu test edilecek maddelerin bulunduğu tüm mikrodilüsyon plakalarına (negatif kontrol hariç) 5 µl olacak şekilde aktararak son konsantrasyon 5×10^5 kob/ml yoğunluğunda elde edilmiştir. Deneyde pozitif kontrol olarak 64-0,03125 µg/ml konsantrasyon aralığında meropenemin ikişer kat azalan seri seyreltileri; negatif kontrol olarak Katyon Ayarlı Muller Hinton Broth (KAMHB) ve bakteri süspansiyonu kullanıldı. Mikrodilüsyon plakları 37 °C’de 24 saat inkube edilmiştir (CLSI, 2012; Demirpek, 2012; Koeth ve ark.,2015). Ayrıca probiyotik mikroorganizmalar için aynı işlemler gerçekleştirilerek besiyeri olarak MRS broth kullanıldı. Tüm deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikrodilüsyon plakları 37 °C’de 48-72 saat inkube edildi. Mikrobiyal üremeyi inhibe eden ve çıplak gözle belirlenen en düşük konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak değerlendirildi.

	McFarland 0.5 bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonu 1:10 oranında seyreltilerek, 10^7 kob /ml inokulum,
	Mikroplakların her bir kuyucuğuna 100 µl (KAMHB) besiyeri eklendi.
	Bitki ekstraları ve saf fenolik bileşiklerin ikişer kat azalan seri seyreltileri yapılarak 12. kuyucuktan dışarı atıldı. En son 5 µl olacak şekilde (negatif kontrol hariç) aktarılarak son konsantrasyon 5×10^5 kob/ml yoğunluğunda elde edilmiştir.
	Mikrobiyal üremeyi tamamen inhibe eden ve çıplak gözle belirlenen en düşük konsantrasyon Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlendi.

Şekil 5 Mikrodilüsyon metodu şematik gösterimi (Ren ve ark.,2017)

Tablo 12. Bitki ekstralarının ve saf fenolik bileşiklerin seri dilüsyon konsantrasyonları (MİK)

Malik asit	p-Kumarik asit	Tannik asit	Kaemferol	Rosmarinik asit	TPS	<i>Satureja cuneifolia</i>
0,7 g/1 mL Çözücü: Etanol(%96)	0,1 g/1 mL Çözücü: Etanol(%96)	0,33 g/1 ml Çözücü: Etanol(%96)	0,017 g/1 mL Çözücü: DMSO	0,2 g/1 mL Çözücü: DMSO	0,167 g/1 mL Çözücü: DMSO	0,167 g/1 mL Çözücü: DMSO
350 mg/ml	50 mg/ml	166,65 mg/ml	8,9 mg/ml	100 mg/ml	83,5 mg/ml	83,5 mg/ml
175 mg/ml	25 mg/ml	83,32 mg/ml	4,4 mg/ml	50 mg/ml	41,75 mg/ml	41,75 mg/ml
87,5 mg/ml	12,5mg/ml	41,66 mg/ml	2,2 mg/ml	25 mg/ml	20,87 mg/ml	20,87 mg/ml
43,7 mg/ml	6,25 mg/ml	20,83 mg/ml	1,1 mg/ml	12,5mg/ml	10,43 mg/ml	10,43 mg/ml
21,8 mg/ml	3,125 mg/ml	10,41 mg/ml	0,5 mg/ml	6,25 mg/ml	5,21 mg/ml	5,21 mg/ml
10,9 mg/ml	1,56 mg/ml	5,20 mg/ml	0,2 mg/ml	3,125 mg/ml	2,60 mg/ml	2,60 mg/ml
5,46 mg/ml	0,78 mg/ml	2,60 mg/ml	0,1 mg/ml	1,56 mg/ml	1,30 mg/ml	1,30 mg/ml
2,73 mg/ml	0,39 mg/ml	1,30 mg/ml	0,05 mg/ml	0,78 mg/ml	0,65 mg/ml	0,65 mg/ml
1,36 mg/ml	0,19 mg/ml	0,65 mg/ml	0,025 mg/ml	0,39 mg/ml	0,32 mg/ml	0,32 mg/ml
0,68 mg/ml	0,09 mg/ml	0,32 mg/ml	0,012 mg/ml	0,19 mg/ml	0,16 mg/ml	0,16 mg/ml
0,34 mg/ml	0,04 mg/ml	0,16 mg/ml	0,006 mg/ml	0,09 mg/ml	0,08 mg/ml	0,08 mg/ml
0,17 mg/ml	0,02 mg/ml	0,08 mg/ml	0,003 mg/ml	0,04 mg/MI	0,04 mg/ml	0,04 mg/ml

5.2.4. Patojen mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi

Çalışma için aktif hale getirilmiş kültürler % 1 (w/v) glukoz ilave edilmiş tryptic soy broth besiyeri içerisinde 37°C’de bir gece inkübasyona tabi tutuldu. Ardından iki kez aktive edilen kültürlerden uygun oranlarda alınarak 0,5 McFarland (1×10^8 kob/ mL) bulanıklığında süspansiyonlar hazırlandı. Hazırlanan % 1’lik TSB-glikoz besiyerinden 100 µl alınarak, herbir kuyucukta 100 µl olacak şekilde mikropipet yardımıyla kuyucuklara eklendi. Daha sonra hazırlanan 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonundan 100’er µl alınarak 96 kuyucuklu F tabanlı polistiren plakaların kuyucuklarına aktarılarak 24 saat 37°C’de aerobik ortamda inkübe edildi. Son konsantrasyon; (TSB-glikoz ile seyreltilmiş bakteri süspansiyonu 1:2 oranında dilüe edilerek bakteri sayısı) 5×10^7 kob/mL olacak şekilde ayarlandı. İnkübasyon sonunda çok kanallı pipet yardımı ile tabana değmeyecek şekilde dikkatlice içerik boşaltıldı. Daha sonra kuyucuklardaki planktonik hücreleri uzaklaştırmak amacıyla plaklar 3 kez 200 µl steril fosfat tamponu (PBS) solüsyonu ile yıkadı. Daha sonra mikrolaka ters çevrilerek içerik boşaltıldı. Yıkama işlemi sonrasında bakteri fiksasyonu için % 99 metanolden her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde aktarılarak 15 dk bekletildi. Daha sonra mikrolaka ters çevrilerek içerik boşaltıldı. Kuyucuklar boşaltıldıktan sonra mikrolak kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminden sonra plaklar 200 µl %0,1’lik kristal viyole çözeltisi ile 15 dakika boyunca boyandı. Ardından musluk altında plak eğik tutularak tabana gelmicek şekilde boya akana kadar yıkandı. Son olarak kuyucuklara %95’lik 200 µl ethanol çözeltisi ilave edilerek 30 dakika bekletildi ve kristal viyole bu sayede çözdürüldü. Negatif kontrol olarak bakteri süspansiyonu ilave edilmemiş TSB kullanıldı. Süre sonunda spektrofotometrik ölçüm yapan mikrolak okuyucu cihazında 595 nm’de okutulacak her bir kuyucuk için optik dansite değeri belirlendi. Cihaz tarafından kaydedilen bu değerler, kontrol kuyucuklarının ortalama optik dansite değerleriyle karşılaştırılarak biyofilm oluşumunun varlığı ve derecesi saptandı. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı. (Dosler ve Karaaslan, 2014; Dinçer ve ark.,2017; Temel ve ark.,2018).

5.2.5. Probiyotik mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi

Her bir suş tarafından biyofilm oluşumu, mikropilaka analizi ile deneye tabi tutulmuştur. Çalışma için aktif hale getirilmiş kültürler % 1'lik (w/v) sükröz ilave edilmiş MRS broth besiyeri içerisinde 37°C'de 48-72 saat aralığında inkübasyona tabi tutuldu. Ardından iki kez aktive edilen kültürlerden uygun oranlarda alınarak 0,5 McFarland (1×10^8 kob/ mL) bulanıklığında süspansiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan % 1'lik MRSB-sükröz besiyerinden 100 µl alınarak, herbir kuyucukta 100 µl olacak şekilde mikropipet yardımıyla kuyucuklara eklendi. Daha sonra hazırlanan 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonundan 100'er µl alınarak 96 kuyucuklu F tabanlı polisitiren plakaların kuyucuklarına aktararak 48-72 saat aralığında 37°C'de aerobik ve anaerobik ortamda inkübe edildi. Son konsantrasyon; (MRSB-sükröz ile seyreltilmiş bakteri süspansiyonu 1:2 oranında dilüe edilerek bakteri sayısı) 5×10^7 kob/mL olacak şekilde ayarlandı. Inkübasyon sonunda çok kanallı pipet yardımı ile tabana değmeyecek şekilde dikkatlice içerik boşaltıldı. Daha sonra kuyucuklardaki planktonik hücreleri uzaklaştırmak amacıyla plaklar 3 kez 200 µl steril fosfat tamponu (PBS) solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra mikropilaka ters çevrilerek içerik boşaltıldı. Yıkama işlemi sonrasında bakteri fiksasyonu için % 99 metanolden her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde aktararak 15 dk bekletildi. Daha sonra mikropilaka ters çevrilerek içerik boşaltıldı. Kuyucuklar boşaltıldıktan sonra mikropilak kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminden sonra plaklar 200 µl %0,1'lik kristal viyole çözeltisi ile 15 dakika boyunca boyandı. Ardından musluk altında plak eğik tutularak tabana gelmicek şekilde boya akana kadar yıkandı. Son olarak kuyucuklara %95'lik 200 µl etanol çözeltisi ilave edilerek 30 dakika bekletildi ve kristal viyole bu sayede çözdürüldü. Negatif kontrol olarak bakteri süspansiyonu ilave edilmemiş MRSB kullanıldı. Süre sonunda spektrofotometrik ölçüm yapan mikropilak okuyucu cihazında 595 nm'de okutulacak her bir kuyucuk için optik dansite değeri belirlendi. Cihaz tarafından kaydedilen bu değerler, kontrol kuyucuklarının ortalama optik dansite değerleriyle karşılaştırılarak biyofilm oluşumunun varlığı ve derecesi saptandı. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı. (Kubota ve ark.,2008; Tahmourespour ve ark., 2011; Dosler ve Karaaslan, 2014; Dinçer ve ark.,2017; Prabhurajeshwar ve ark.,2017; Temel ve ark.,2018).

Optik yoğunluk değeri (OD) = Eşik değeri = Negatif kontrol kuyucuklarının OD ortalaması + negatif kontrol kuyucukların 3 × negatif kontrolün standart sapma değeri

Tablo 13. Biyofilm üretiminin yorumlanması (Hassan ve ark.,2011).

Ortalama OD değeri	Biyofilm üretimi
OD değeri	Adezyon
OD kontrol > OD MB	Yapışma Olmayan
OD kontrol < OD MB < 2 OD kontrol	Zayıf Biyofilm
2 OD kontrol < OD MB < 4 OD kontrol	Orta Biyofilm
4 OD kontrol < OD MB	Güçlü Biyofilm

Biyofilm oluşturmayan	Zayıf Biyofilm oluşturan	Orta Biyofilm oluşturan	Güçlü Biyofilm oluşturan
			

Resim 13. Biyofilm oluşturma renk skalası

5.2.6. Bitki ekstraları ve saf fenolik bileşiklerin biyofilm gelişimi üzerine etkisi

Bitki ekstraları (*Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii* ile *Satureja cuneifolia*) ve saf fenolik bileşiklerin (Rosmarinik asit, Tannik asit, Malik asit, Kaempferol, p-Kumarik asit) biyofilm gelişimi üzerine etkisi araştırıldı. Patojen mikroorganizmalar %1'lik TSB-glikoz besiyerine ekilerek 37°C'de bir gece inkübasyona tabi tutuldu. Aktifleştirilen süspansiyondan örnek alınarak TSB-glikoz besiyerinde McFarland 0,5 bulanıklık standardına eşdeğer bakteri süspansiyonları hazırlandı. İlk olarak her bir kuyucuğa 100 µL TSB-glikoz besiyeri düz tabanlı mikropalakların kuyucuklarına dağıtıldı. Daha sonra bitki ekstraların ve saf fenolik bileşiklerin test edildiği her bir suşa karşı tespit edilen MİK değerleri alınarak deney gerçekleştirildi. İlk kuyucuğa 100 µL bitki ekstresi eklenerek seri dilüsyonları yapıldı. En son olarak 100 µL bakteri süspansiyonu (0,5 McFarland'a ayarlanmış süspansiyon TSB-glikoz besiyerinde dilüe edildi. Son final konsantrasyonu 5×10^5 kob/ml yoğunluğunda olacak şekilde süspansiyonlar elde edilmiştir) herbir mikropalağa eklenerek toplam hacim 200 µL olmaktadır. Hazırlanan mikropalaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Kuyucuklar otomatik pipet ile dikkatli bir şekilde boşaltıldı. Daha sonra kuyucuklar 3 kez PBS ile yıkanarak ters çevrildi. Yıkamadan sonra kuyucuklara 200 µL % 99'luk metanol eklendi ve 15 dakika bekletildi. 15 dakika sonunda mikropalaka ters çevrilerek içerik döküldü. Ardından kuyucuklara % 0,1'lik kritsal viyole 200 µL eklenerek 30 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresi dolduktan sonra mikropalate tabana değmicek şekilde muslukta yıkanarak boya akıtıldı. Son olarak kuyucuklara 200 µL % 95'lik etanol eklenerek 30 dakika bekletildi, ve süre sonunda mikropalak okuyucuda 595 nm'de optik dansite değerleri ölçülmüştür. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraları ve saf fenolik bileşikler ile inkübe edildi her bir süşun optik dansite değerlerinin aritmetik ortalamaları alındı. Pozitif kontrol olarak kuyucuklara bitkisel ajanlar içermeyen bakteri süspansiyonu ve çözücüler DMSO ve Etanol olan bitkisel ajanların pozitif kontrolü olarak DMSO ve Etanol içeren bakteri süspansiyonu, bitki ajanların negatif kontrolü olarak ise kuyucuklara bakteri süspansiyonu içermeyen farklı konsantrasyonlarda bitkisel ajanlar eklendi. Bitkisel ajan içeren kuyucukların absorbans değerlerinden negatif bitkisel ajanların kontrolünün absorbans değeri çıkartıldı. Uygulanan yöntemle göre negatif ve pozitif kontrol kuyucuklarının optik dansite değerleri ölçüldü ve ortalama değeri alındı. Her

suşun pozitif kontrol OD değeri %100 olarak kabul edildi. Uygulanan ekstrelerin ve saf fenolik bileşiklerin biyofilm gelişimi üzerine etkisi pozitif kontrol ile kıyaslanarak biyofilm inhibisyon/oluşturma % değeri hesaplandı. Ayrıca probiyotik mikroorganizmalar için aynı işlemler birkaç farklılıkla gerçekleştirildi. Besiyeri olarak %1 lik MRSB-sükroz besiyeri kullanıldı. Tüm deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve 37 °C’de 48-72 saat inkube edildi. (Dosler ve Karaaslan, 2014; Merritt ve ark.,2015; Tutar., 2018).

Tablo 14. Biyofilm Değişim Oranı (Dosler ve Karaaslan, 2014; Merritt ve ark.,2015; Ahmad ve ark., 2017; Tutar., 2018).

$\% \text{ İnhibisyon} = (\text{Akontrol} - \text{Aörnek} / \text{Akontrol}) \times 100$
$\% \text{ Oluşturma} = (\text{Akontrol} - \text{Aörnek} / \text{Akontrol}) \times 100$
Akontrol: Pozitif kontrol (bitki içermeyen;sadece besiyeri ve mikroorganizma bulunduran) içeren 595 nm’deki absorbans değeri
Aörnek: Test (mikroorganizma+besiyeri+bitki ekstresi) kuyucuklarını içeren 595 nm’deki absorbans değeri

6. BULGULAR

6.1. Gram boyama testi sonuçları

Gram boyama testi sonuçlarına göre, 12 adet bakteri Gram (+), 8 adet bakteri gram negatif olarak tanımlandı. Mikroskopik inceleme sonucunda, probiyotik mikroorganizmaların Gram (+) özellikte olması nedeniyle, Gram (-) bakterilerden ayırt edilmişlerdir.

Tablo 15. Çalışmamızda yer alan mikroorganizmaların Gram boyama test sonuçları

Test suşu	Gram boyama
<i>Staphylococcus aureus</i>	(+)
<i>Escherichia coli</i>	(-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(-)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(-)
<i>Salmonella typhimurium</i>	(-)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	(+)
<i>Enterococcus faecium</i>	(+)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	(+)
<i>Lactobacillus kefir</i>	(+)
<i>Bifidobacterium spp.</i>	(+)
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	(+)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	(+)
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258	(+)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521	(+)
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	(+)

(+) Pozitif (-) Negatif Sonuç

6.2. Farklı bitki ekstraktları ve saf fenolik bileşiklerin patojen ve probiyotik mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisinin değerlendirilmesi

Çalışmamızda yer alan 7 adet olmak üzere 2'si bitki türünden elde edilen bitki ekstresi ve ticari firmalardan satın alınan saf fenolik bileşiklerin patojen suşlara ve probiyotik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) standartlarına göre saptanmıştır.

6.2.1. Disk difüzyon deneyi

Bitki ekstraktları ve saf fenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonlarında (Malik asit 0.7 g/1 mL-Çözücü: Etanol (%96), p-Kumarik asit 0.1 g/1 mL-Çözücü: Etanol(%96), Tannik asit 0,33 g/1 mL-Çözücü: Etanol(%96), Kaemferol 0.017 g/1 mL-Çözücü: DMSO, Rosmarinik asit 0,2 g/1 mL-Çözücü: DMSO, TPS 0,16 g/1 mL-Çözücü: DMSO, Satureja cuneifolia-0,16 g/1 mL-Çözücü: DMSO) hazırlanan çözeltilerin 20 bakteri üzerine antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemiyle saptanmıştır.

DMSO ve Etanol çözücülerinde emdirilerek hazırlanan diskler negatif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrol olarak MEM (Meropenem) içeren diskler kullanıldı. Bitki ekstraktlarının ve saf fenolik bileşiklerin bakteriler üzerinde farklı oranlarda antimikrobiyal etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Sonuçlar 3 tekrarlı çalışmanın ortalaması alınarak verildi. Çalışmamızda yer alan malik asitin standart mikroorganizmalardan *Staphylococcus aureus*'a karşı (2,28 mm/zon); standart probiyotik mikroorganizmalardan *Streptococcus thermophilus*'a karşı (44,27 mm/zon); tannik asitin standart mikroorganizmalardan *Staphylococcus aureus*'a karşı (25,48 mm/zon); standart probiyotik mikroorganizmalardan *Streptococcus thermophilus*'a karşı (20,51 mm/zon; p-Kumarik asitin standart mikroorganizmalardan *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı (17,51 mm/zon); standart probiyotik mikroorganizmalardan *Streptococcus thermophilus*'a karşı (30,06 mm/zon; rosmarinik asitin standart mikroorganizmalardan *Staphylococcus aureus*'a karşı (10,11 mm/zon); probiyotik mikroorganizmalardan *Lactobacillus plantarum*'a karşı (13,34 mm/zon); *Thymus praecox subsp. skorpilii* var. *skorpilii*'nin klinik (MRSA)'ya

karşı (19,07 mm/zon); probiyotik mikroorganizmalardan *Streptococcus thermophilus*'a karşı (20,64 mm/zon); *Satureja cuneifolia*'nın standart mikroorganizmalardan *Staphylococcus aureus*'a karşı (58,11 mm/zon); probiyotik mikroorganizmalardan *Streptococcus thermophilus*'a karşı (33,77 mm/zon) en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 16. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Meropenemin Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) Standartlarına Göre Zon ÇapıYorumlama Standartları

Antimikrobiyal ajan	Disk Miktarı	Disk Difüzyon QC Aralıkları, mm (CLSI M100-ED30:2020)	
		<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853
Meropenem	10 µg	28–35 mm/zon	27–33 mm/zon

CLSI, 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA

Tablo 17. Malik Asit, p-Kumarik Asit ve Tannik Asitin Patojen Mikroorganizmalara Karşı Disk Difüzyon Testi ile Belirlenmesi

İnhibisyon zonunun çapı (mm)					
Bitki Ekstreleri ve Saf Fenolik Bileşikler					
Patojen Mikroorganizmalar	Malik asit	p-Kumarik asit	Tannik asit	Meropenem (10 µg/disk)	%96 Etanol
MRSA (kandan)	21,89 mm/zon	9,98 mm/zon	24,74 mm/zon	26,50 mm/zon	-
<i>Escherichia coli</i> (idrardan)	19,36 mm/zon	-	15,43 mm/zon	30,92 mm/zon	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (yaradan)	19,49 mm/zon	9,85 mm/zon	24,16 mm/zon	27,82 mm/zon	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (trakeal aspirattan)	19,90 mm/zon	15,84 mm/zon	13,45 mm/zon	28,17 mm/zon	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (dışkıdan)	19,54 mm/zon	-	15,04 mm/zon	31,60 mm/zon	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	22,28 mm/zon	9,24 mm/zon	25,48 mm/zon	26,70 mm/zon	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15,45 mm/zon	9,20 mm/zon	18,19 mm/zon	30,00 mm/zon	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	19,00 mm/zon	8,71 mm/zon	25,25 mm/zon	32,50 mm/zon	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	16,13 mm/zon	17,51 mm/zon	14,32 mm/zon	30,42 mm/zon	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	21,86 mm/zon	-	21,81 mm/zon	31,20 mm/zon	-

Pozitif kontrol; Antibiyotik; MEM= meropenem (10 µg/disk), Negatif kontrol; %96'lık Etanol, (-):inhibisyon yok.

Tablo 18. Malik Asit, p-Kumarik Asit ve Tannik Asitin Probiyotik Mikroorganizmalara Karşı Disk Difüzyon Testi ile Belirlenmesi

İnhibisyon zonunun çapı (mm)					
Bitki Ekstreleri ve Saf Fenolik Bileşikler					
Probiyotik Mikroorganizmalar	Malik asit	p-Kumarik asit	Tannik asit	Meropenem (10 µg/disk)	%96 Etanol
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	15,89 mm/zon	15,98 mm/zon	16,98 mm/zon	18,65 mm/zon	-
<i>Enterococcus faecium</i>	10,49 mm/zon	18,57 mm/zon	18,55 mm/zon	12,33 mm/zon	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	15,00 mm/zon	19,50 mm/zon	13,27 mm/zon	-
<i>Lactobacillus kefir</i>	17,60 mm/zon	16,98 mm/zon	19,03 mm/zon	14,26 mm/zon	-
<i>Bifidobacterium spp.</i>	9,58 mm/zon	15,30 mm/zon	18,97 mm/zon	14,57 mm/zon	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	-	12,95 mm/zon	15,05 mm/zon	39,74 mm/zon	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	9,80 mm/zon	-	13,00 mm/zon	38,12 mm/zon	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258	44,27 mm/zon	30,06 mm/zon	20,51 mm/zon	38,58 mm/zon	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521	15,68 mm/zon	10,38 mm/zon	20,38 mm/zon	64,10 mm/zon	-
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	25,97 mm/zon	11,53 mm/zon	15,05 mm/zon	30,77 mm/zon	-

Pozitif kontrol; Antibiyotik; MEM= meropenem (10 µg/disk), Negatif kontrol; %96'lık Etanol, (-):inhibisyon yok.

Tablo 19. *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii* (TPS), *Satureja cuneifolia*, Kaemferol ve Rosmarinik Asit Patojen Mikroorganizmalara Karşı Disk Difüzyon Testi ile Belirlenmesi

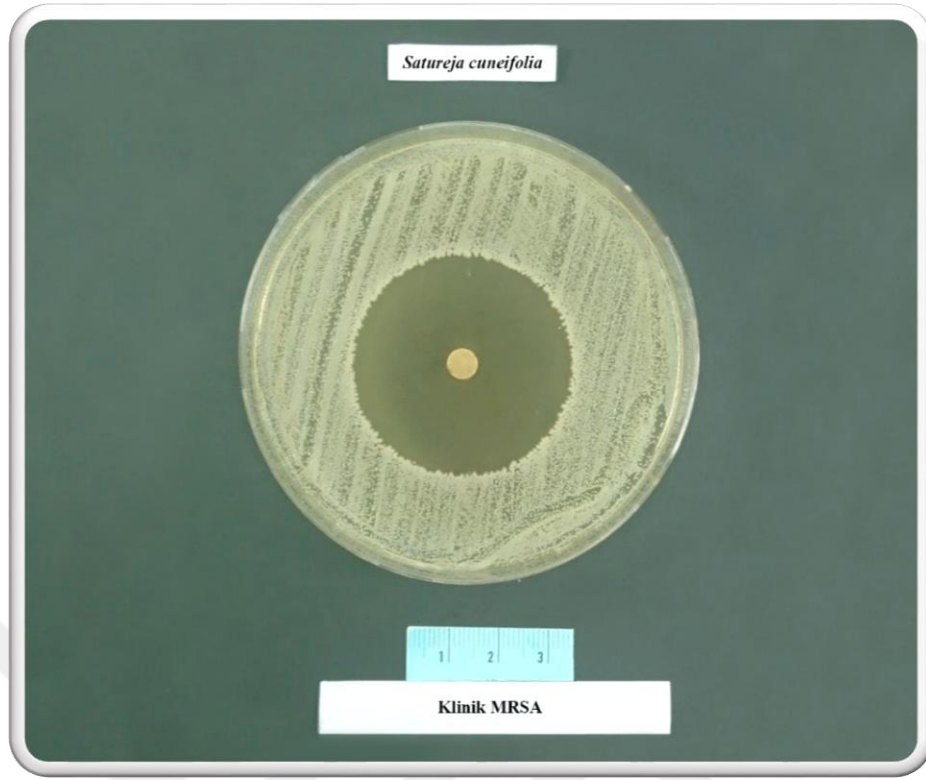
İnhibisyon zonunun çapı (mm)						
Bitki Ekstreleri ve Saf Fenolik Bileşikler						
Patojen Mikroorganizmalar	TPS	<i>Satureja cuneifolia</i>	Kaemferol	Rosmarinik asit	Meropenem (10 µg/disk)	%100 DMSO
<i>Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus (kandan)</i>	19,07 mm/zon	42,12 mm/zon	-	9,75 mm/zon	26,50 mm/zon	-
<i>Escherichia coli (idrardan)</i>	-	9,68 mm/zon	-	-	30,92 mm/zon	-
<i>Pseudomonas aeruginosa (yaradan)</i>	-	12,36 mm/zon	-	9,07 mm/zon	27,82 mm/zon	-
<i>Klebsiella pneumoniae (trakeal aspirattan)</i>	-	10,20 mm/zon	-	8,71 mm/zon	28,17 mm/zon	-
<i>Salmonella typhimurium (dışkıdan)</i>	-	10,54 mm/zon	-	-	31,60 mm/zon	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	-	58,11 mm/zon	-	10,11 mm/zon	26,70 mm/zon	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	14,13 mm/zon	-	9,36 mm/zon	30,00 mm/zon	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	11,97 mm/zon	-	9,76 mm/zon	32,50 mm/zon	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	-	14,13 mm/zon	-	-	30,42 mm/zon	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	8,33 mm/zon	15,96 mm/zon	-	8,62 mm/zon	31,20 mm/zon	-

Pozitif kontrol; Antibiyotik; MEM= meropenem (10 µg/disk), Negatif kontrol; %96'lık Etanol, (-):inhibisyon yok.

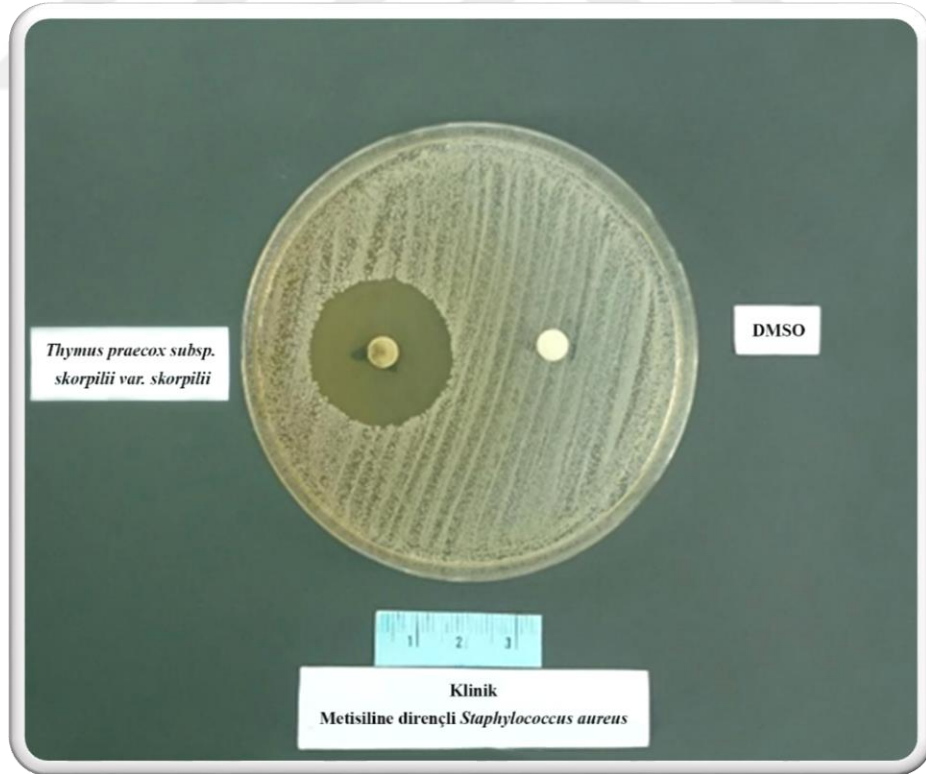
Tablo 20. *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii* (TPS), *Satureja cuneifolia*, Kaemferol ve Rosmarinik Asit Probiyotik Mikroorganizmalara Karşı Disk Difüzyon Testi ile Belirlenmesi

İnhibisyon zonunun çapı (mm)						
Bitki Ekstreleri ve Saf Fenolik Bileşikler						
Probiyotik Mikroorganizmalar	TPS	<i>Satureja cuneifolia</i>	Kaemferol	Rosmarinik asit	Meropenem (10µg/disk)	%100 DMSO
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	9,38 mm/zon	22,24 mm/zon	-	-	18,65 mm/zon	-
<i>Enterococcus faecium</i>	8,50 mm/zon	12,74 mm/zon	-	-	12,33 mm/zon	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	11,50 mm/zon	15,52 mm/zon	-	13,34 mm/zon	13,27 mm/zon	-
<i>Lactobacillus kefir</i>	-	29,44 mm/zon	-	8,49 mm/zon	14,26 mm/zon	-
<i>Bifidobacterium spp.</i>	7,62 mm/zon	10,59 mm/zon	-	-	14,57 mm/zon	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	-	16,79 mm/zon	-	-	39,74 mm/zon	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	-	10,73 mm/zon	-	-	38,12 mm/zon	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258	20,64 mm/zon	33,77 mm/zon	-	-	38,58 mm/zon	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521	13,40 mm/zon	7,50 mm/zon	-	-	64,10 mm/zon	-
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	-	-	-	-	30,77 mm/zon	-

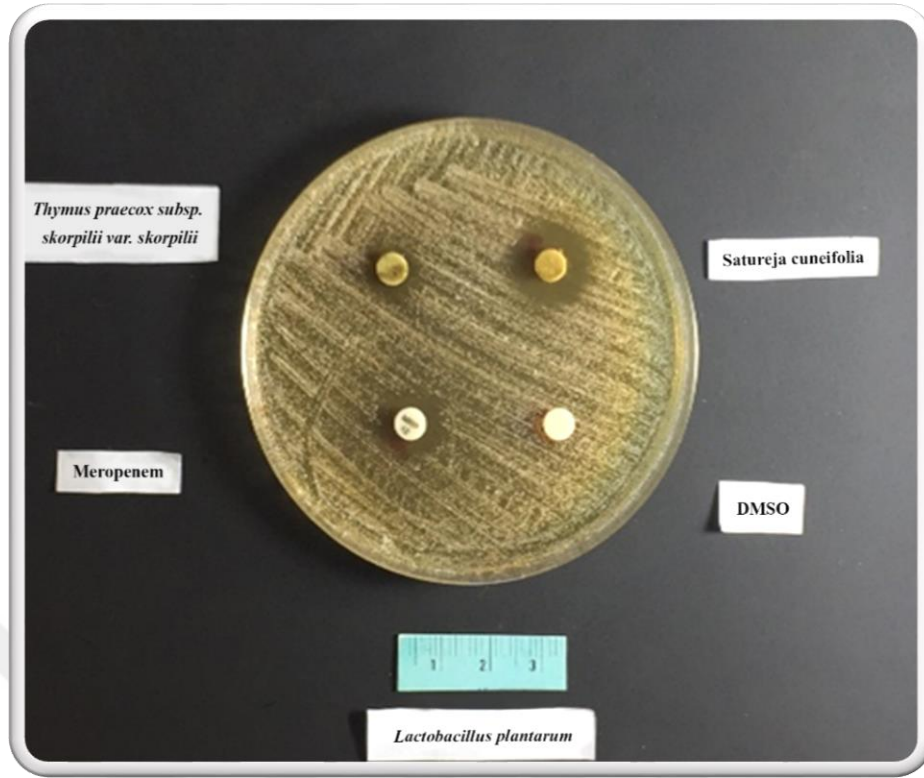
Pozitif kontrol; Antibiyotik; MEM= meropenem (10 µg/disk), Negatif kontrol;%96'lık Etanol, (-):inhibisyon yok.



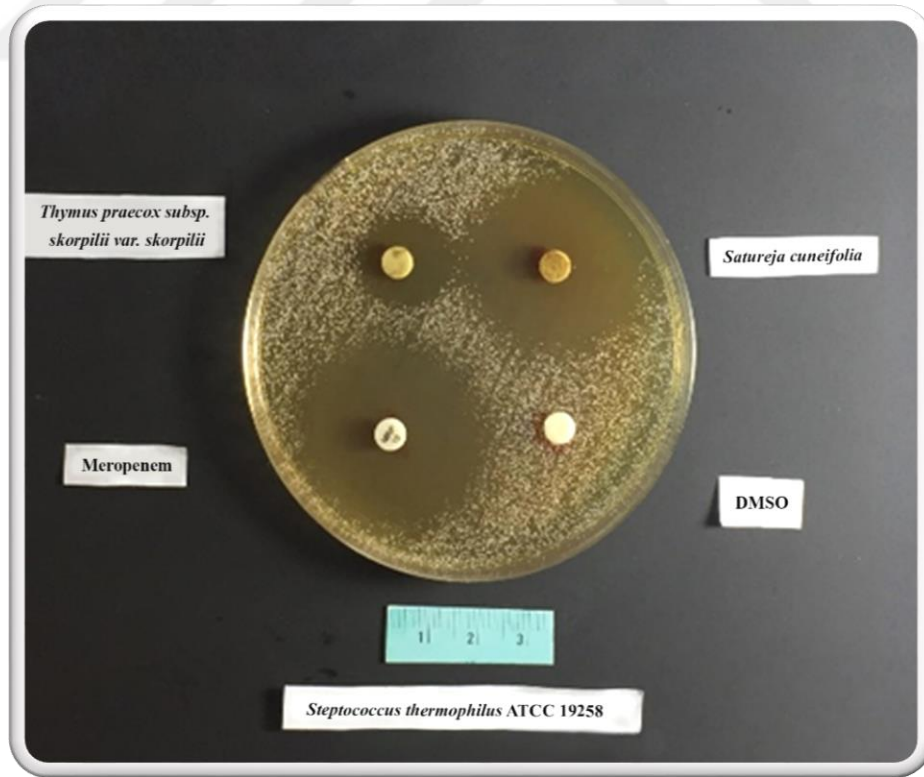
Resim 14. *Satureja cuneifolia* ekstresinin klinik MRSA'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi



Resim 15 *Thymus praecox subsp.skorpilii var. skorpilii* ekstresinin klinik MRSA'ya karşı antimikrobiyal aktivitesi



Resim 16. *Thymus praecox subsp. skorpilii var. skorpilii* ve *Satureja cuneifolia* ekstrelerinin *Lactobacillus plantarum*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi



Resim 17. *Thymus praecox subsp. skorpilii var. skorpilii* ve *Satureja cuneifolia* ekstrelerinin *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258'e karşı antimikrobiyal aktivitesi

6.2.2. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) sonuçları

Çalışmada kullanılan bitki ekstralarının ve saf fenolik bileşiklerin antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek amacıyla inhibisyon zon çapları ölçüldükten sonra MİK değerleri belirlenmiştir. MİK mikroorganizmaların üremesini engellemek için gerekli olan en az etken madde veya antibiyotik miktarı olarak bildirilmiştir. MİK değeri sonuçları Tablo 21 ve Tablo 22’te gösterilmiştir.

Tablo 21. Meropenemin Clinical Laboratory Standards Institute Standartlarına Göre MİK Aralıkları

Antimikrobiyal ajan	MIC QC Aralıkları, µg / mL (CLSI M100-ED30:2020)	
	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853
Meropenem	0,008–0,06 µg / Ml	0,12–1 µg / mL

CLSI, 2012. Clinical and Laboratory Standards Insitute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA

Tablo 22. Bitki ekstralarının ve saf fenolik bileşiklerin patojen mikroorganizmalar üzerine Minimum İnhibitör Konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi

Minimum İnhibitör Konsantrasyon (mg/ml)								
Bitki Ekstreleri ve Saf Fenolik Bileşikler								
Patojen Mikroorganizmalar	Malik asit (mg/ml)	p-Kumarik asit (mg/ml)	Tannik asit (mg/ml)	TPS (mg/ml)	<i>Satureja cuneifolia</i> (mg/ml)	Kaemferol	Rosmarinik asit	Meropem
<i>Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus</i> (klinik)	5,46 mg/ml	1,56 mg/ml	2,60 mg/ml	2,60 mg/ml	0,65 mg/ml	-	8,03 mg/ml	0,125 µg/ml
<i>Escherichia coli</i> (klinik)	2,73 mg/ml	1,56 mg/ml	0,65 mg/ml	0,65 mg/ml	0,65 mg/ml	-	8,03 mg/ml	0,0625 µg/ml
<i>P.aeruginosa</i> (klinik)	2,73 mg/ml	1,56 mg/ml	2,60 mg/ml	10,43 mg/ml	2,60 mg/ml	-	16,07 mg/ml	0,125 µg/ml
<i>Klebsiella pneumonia</i> (klinik)	2,73 mg/ml	1,56 mg/ml	1,30 mg/ml	2,60 mg/ml	5,21 mg/ml	-	16,07 mg/ml	0,031 µg/ml
<i>Salmonella typhimurium</i> (klinik)	2,73 mg/ml	0,78 mg/ml	1,30 mg/ml	5,21 mg/ml	5,21 mg/ml	-	8,03 mg/ml	0,125 µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	0,34 mg/ml	1,56 mg/ml	2,60 mg/ml	5,21 mg/ml	0,08 mg/ml	-	1 mg/ml	0,0625 µg/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,73 mg/ml	1,56 mg/ml	1,30 mg/ml	2,60 mg/ml	5,21 mg/ml	-	8,03 mg/ml	0,015 µg/ml
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,36 mg/ml	0,78 mg/ml	2,60 mg/ml	2,60 mg/ml	5,21 mg/ml	-	8,03 mg/ml	1 µg/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	5,5 mg/ml	1,56 mg/ml	2,60 mg/ml	10,43 mg/ml	5,21 mg/ml	-	8,03 mg/ml	0,0625 µg/ml
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	5,5 mg/ml	3,12 mg/ml	2,60 mg/ml	2,60 mg/ml	2,60 mg/ml	-	8,03 mg/ml	0,015 µg/ml

Tablo 23. Bitki ekstralarının ve saf fenolik bileşiklerin probiyotik mikroorganizmalar üzerine Minimum İnhibitör Konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi

Minimum İnhibitör Konsantrasyon (mg/ml)								
Bitki Ekstreleri ve Saf Fenolik Bileşikler asit (mg/								
Probiyotik Mikroorganizmalar	Malik asit (mg/ml)	p-Kumarik asit (mg/ml)	Tannik asit (mg/ml)	TPS (mg/ml)	<i>Satureja cuneifolia</i>	Kaempferol	Rosmarinik ml)	Meropenem (µg/ml)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2,73 mg/ml	0,78 mg/ml	2,60 mg/ml	0,65 mg/ml	0,16 mg/ml	-	4,01 mg/ml	8 µg/ml
<i>Enterococcus faecium</i>	10,9 mg/ml	0,78 mg/ml	5,20 mg/ml	0,65 mg/ml	0,32 mg/ml	-	2 mg/ml	8 µg/ml
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5,46 mg/ml	1,56 mg/ml	2,60 mg/ml	10,43 mg/ml	5,21 mg/ml	-	16,07 mg/ml	0,5 µg/ml
<i>Lactobacillus kefir</i>	5,46 mg/ml	1,56 mg/ml	2,60 mg/ml	10,43 mg/ml	2,60 mg/ml		8,03 mg/ml	4 µg/ml
<i>Bifidobacterium spp.</i>	1,36 mg/ml	3,125 mg/ml	5,20 mg/ml	20,87 mg/ml	10,43 mg/ml	-	32,14 mg/ml	0,5 µg/ml
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	10,9 mg/ml	3,125 mg/ml	5,20 mg/ml	5,21 mg/ml	1,30 mg/ml	-	32,14 mg/ml	2 µg/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	10,9 mg/ml	3,125 mg/ml	5,20 mg/ml	5,21 mg/ml	2,60 mg/ml	-	16,07 mg/ml	0,0625 µg/ml
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258	1,36 mg/ml	0,78 mg/ml	5,20 mg/ml	5,21 mg/ml	0,65 mg/ml	-	1 mg/ml	1 µg/ml
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521	10,9 mg/ml	3,125 mg/ml	5,20 mg/ml	10,43 mg/ml	10,43 mg/ml	-	32,14 mg/ml	0,0312 µg/ml
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	5,46 mg/ml	3,125 mg/ml	5,20 mg/ml	20,87 mg/ml	20,87 mg/ml	-	16,07 mg/ml	0,25 µg/ml

Meropenem antibiyotiği ≥ 8 µg/ml olan MİK değerinde ise probiyotik mikroorganizma “orta düzeyde dirençli”, 32 µg/ml’nin üzerinde ise antibiyotiğe “klinik olarak dirençli” olarak kabul edilmiştir (D’Aimmo ve ar.,2007; Özteber.,2013).

Meropenem (MEM) antibiyotiği kontrol olarak kullanılmıştır. MEM'in antibakteriyel etki spektrumu klinik olarak önemli olan gram negatif ve gram pozitif, aerobik ile anaerobik bakteri suşlarının büyük bir kısmını kapsamaktadır. Zon çapları ve minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin birbirleri ile olan ilişkileri göz önünde bulundurularak tespit edilmiştir.

Tablo 24. Meropenemin Antimikrobiyal Aktivitesi

Disk/MiK Sonuçları	Değerlendirme Kriterleri	
	Zon apı (mm)	MİK Sınır Değerleri (mg/L)
Duyarlı (S)	≥ 14	≤ 4
Orta derecede duyarlı (O)	12-13	8
Dirençli (R)	≤ 11	≥ 16

(https://drive.google.com/file/d/1sgBadjX_t2_dhTCub4xwUrgAltITIBE7, Erişim tarihi: 7 Mart 2020).

6.3. Patojen mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin değerlendirilmesi

İzolatların biyofilm oluşturma yeteneği % 1'lik glikozlu TSB besiyerinde mikrotitrasyon yöntemi ile tespit edildi. Koyu mavi renkli koloni oluşumu yüksek biyofilme işaret ederken açık renkli koloni oluşumu zayıf biyofilm oluşumunun belirtici olarak gösterilmiştir. Kristal viyole ile gerçekleştirilen boyama sonucunda, mikroplaklar üzerinde oluşmuş biyofilm gözle görünür hale gelmiştir.

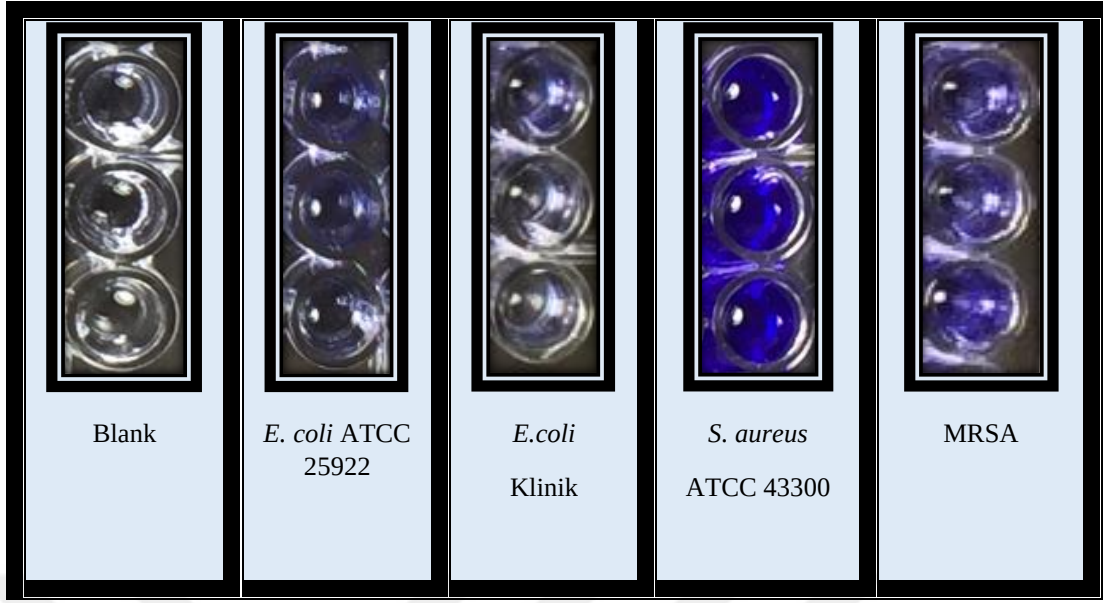
Tablo 25. Patojen mikroorganizmaların 24 saatlik inkübasyon sonunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri

Suş Adı	OD ₅₉₅ Ölçüm Sonuçları	Biyofilm OD Değeri OD ± SD	Biyofilm Üretim Düzeyleri
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,480	0,480 ±0,01	++
<i>Escherichia coli</i> (klinik)	0,318	0,318±0,02	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	2,474	2,474±0,014	+++
<i>Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus</i> (klinik)	0,551	0,551±0,01	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	2,673	2,673±0,060	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (klinik)	1,829	1,829 ±0,018	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1,802	1,802±0,016	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (klinik)	1,15	1,715±0,018	+++
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	0,321	0,321±0,011	++
<i>Salmonella typhimurium</i> (klinik)	0,296	0,296±0,007	++

+, zayıf biyofilm oluşturma yeteneği,

++, orta düzeyde biyofilm oluşturma yeteneği,

+++; güçlü düzeyde biyofilm oluşturma yeteneği.



Resim 18. Kristal viyole boyama yöntemi ile biyofilm oluşumunun temsili görüntüleri

6.4. Probiyotik mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin değerlendirilmesi

İzolatların biyofilm oluşturup oluşturmadığı % 1'lik sükrozlu MRSB besiyerinde mikrotitrasyon yöntemi ile tespit edildi. Koyu mavi renkli koloni oluşumu yüksek biyofilme işaret ederken açık renkli koloni oluşumu zayıf biyofilm oluşumunun belirteci olarak gösterilmiştir. Kristal viyole ile gerçekleştirilen boyama sonucunda, mikroplaklar üzerinde oluşmuş biyofilm gözle görünür hale gelmiştir.

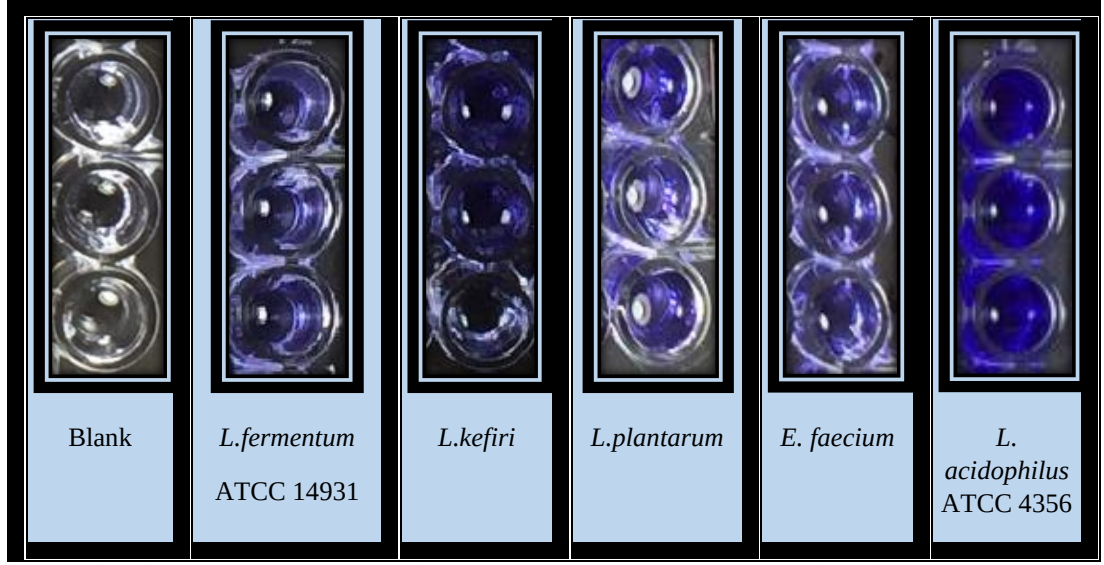
Tablo 26. Probiyotik mikroorganizmaların 48 saat ile 72 saatlik inkübasyon sonunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri

Suş Adı	OD ₅₉₅ Ölçüm Sonuçları	Biyofilm OD Değeri OD ± SD	Biyofilm Üretim Düzeyleri
<i>L. fermentum</i> ATCC 14931	0,348	0,348 ±0,009	++
<i>L.kefiri</i>	0,911	0,911 ±0,022	+++
<i>L.plantarum</i>	0,420	0,420 ±0,000	+++
<i>E.faecium</i>	0,545	0,545 ±0,023	++
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	2,726	2,726 ±0,012	+++
<i>L.rhamnosus</i>	0,678	0678 ±0,025	++
<i>S. thermophilus</i> ATCC 19258	0,925	0,925±0,005	+++
<i>Bifidobacterium spp.</i>	1,209	1,209±0,034	+++
<i>B. longum</i> ATCC 15707	0,431	0,431±0,019	++
<i>B. bifidum</i> ATCC 29521	2,600	2,600±0,024	+++

++; zayıf biyofilm oluşturma yeteneği,

+++; orta düzeyde biyofilm oluşturma yeteneği,

+++; güçlü düzeyde biyofilm oluşturma yeteneği.

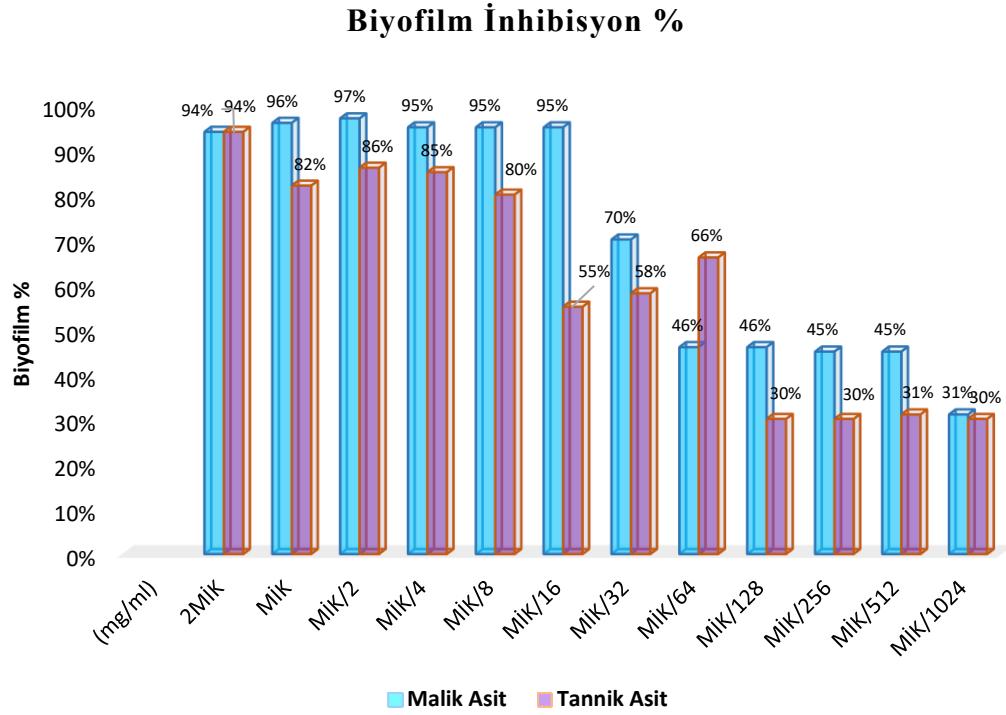


Resim 19. Kristal viyole boyama yöntemi ile biyofilm oluşumunun temsili görüntüleri.

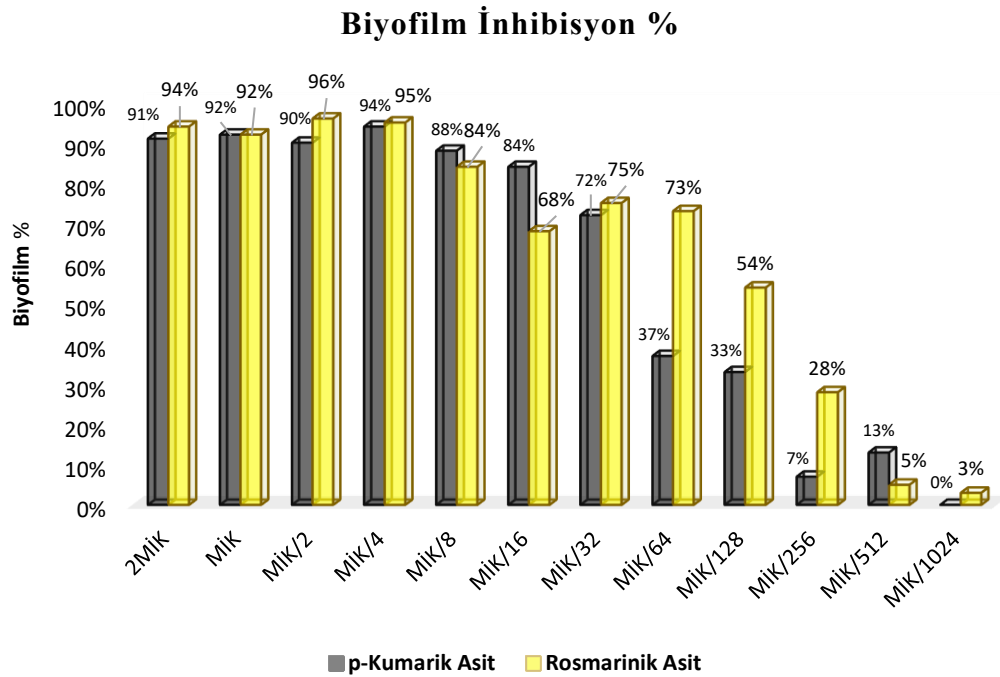
6.5. Bitki ekstreleri ve saf fenolik bileşiklerin biyofilm gelişimi üzerine etkisi

Bitki ekstreleri ve saf fenolik bileşiklerin biyofilm gelişimi üzerine etkisi araştırılarak, biyofilm gelişim inhibisyon/oluşturma yüzdeleri belirlendi. Herbir mikroorganizma için bitki ekstreleri ve saf fenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Buna göre bitkisel ajanların uygulandığı patojen mikroorganizmalar üzerinde biyofilm gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır. Probiyotik mikroorganizmaların belirli konsantrasyonda biyofilm gelişimini arttırarak etkili olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda yer alan saf fenolik bileşiklerden Kaemferol'ün MİK değeri tespit edilemediği için biyofilm gelişimi üzerine aktivitesi denenmemiştir.

Bitkisel ajanların *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 suşu üzerine biyofilm inhibisyon oranları

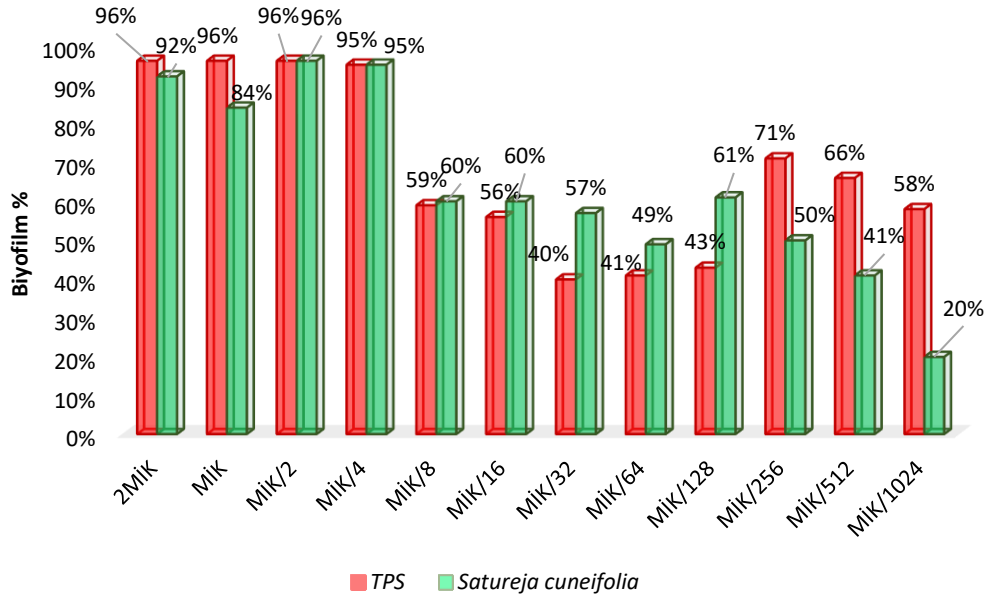


Şekil 6. Malik Asit ve Tannik Asitin *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması



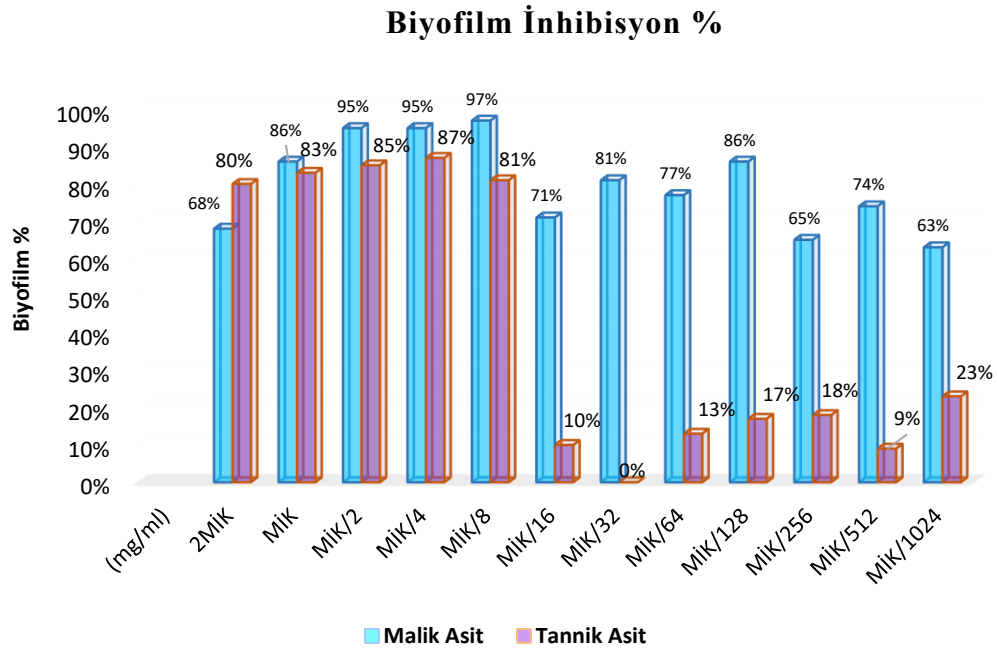
Şekil 7. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Biyofilm İnhibisyon %

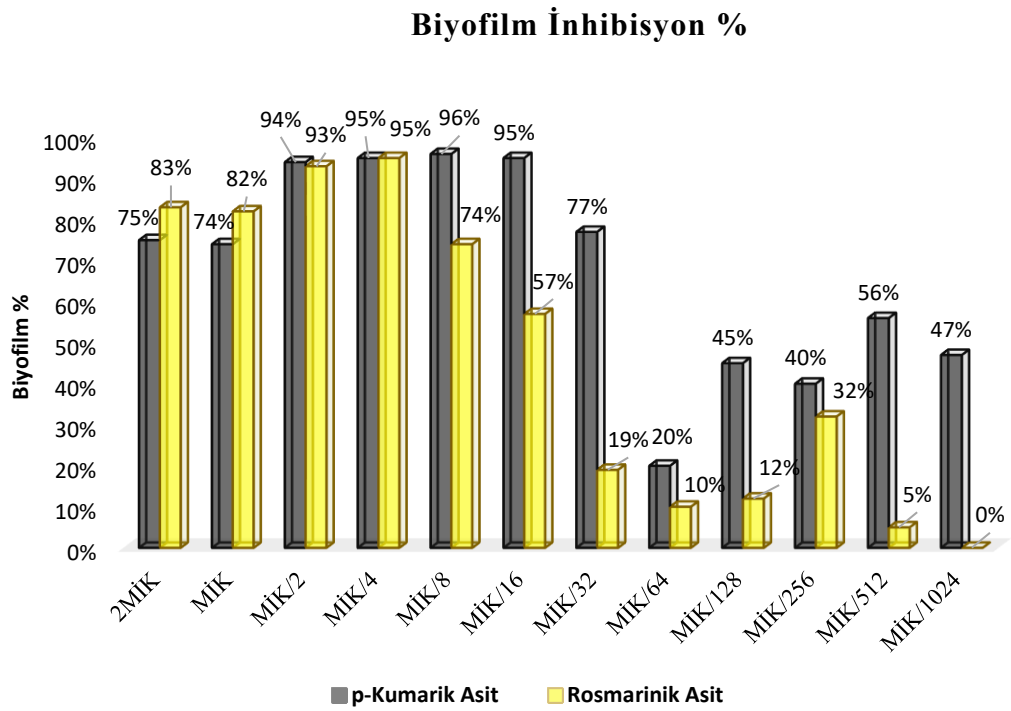


Şekil 8. *Thymus praecox subsp.skorpilii* var. *skorpilii* ve *Satureja cuneifolia*'nın *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Bitkisel ajanların *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 suşu üzerine biyofilm inhibisyon oranları

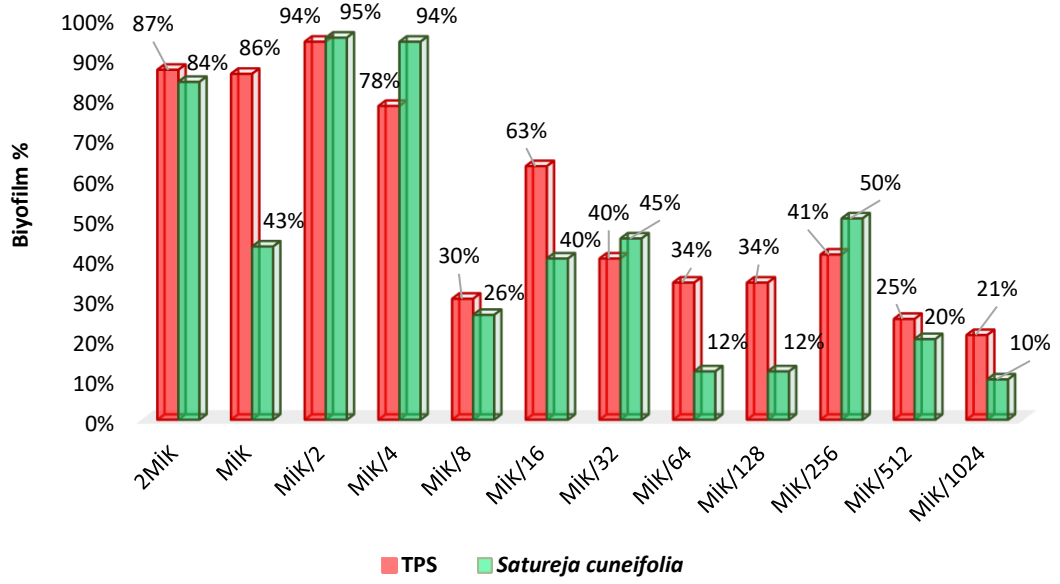


Şekil 9 Malik Asit ve Tannik Asitin *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması



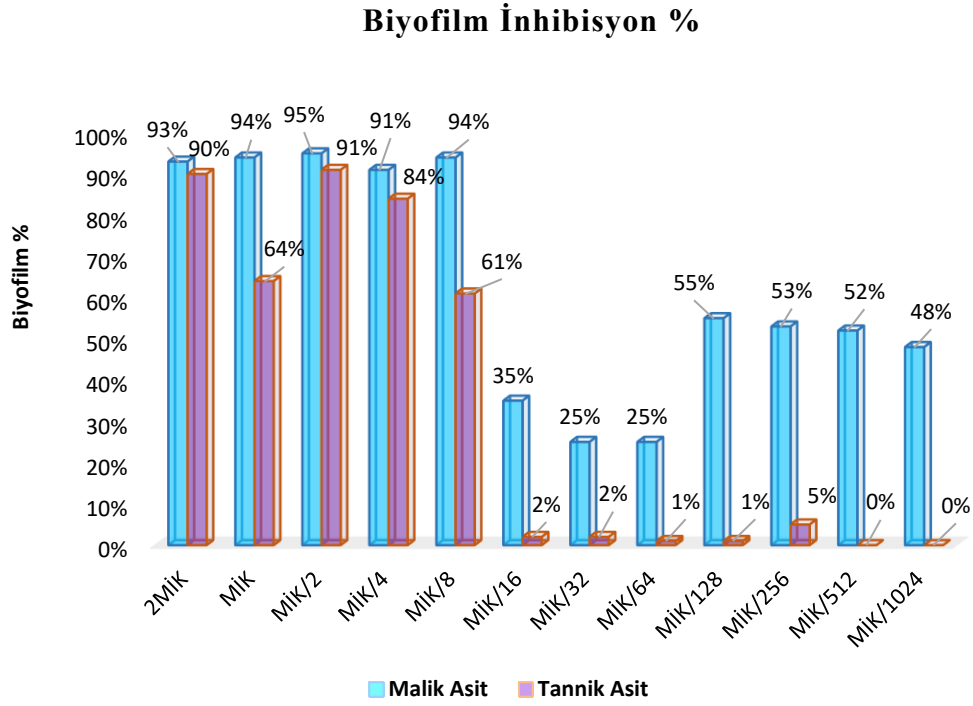
Şekil 10. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Biyofilm İnhibisyon %

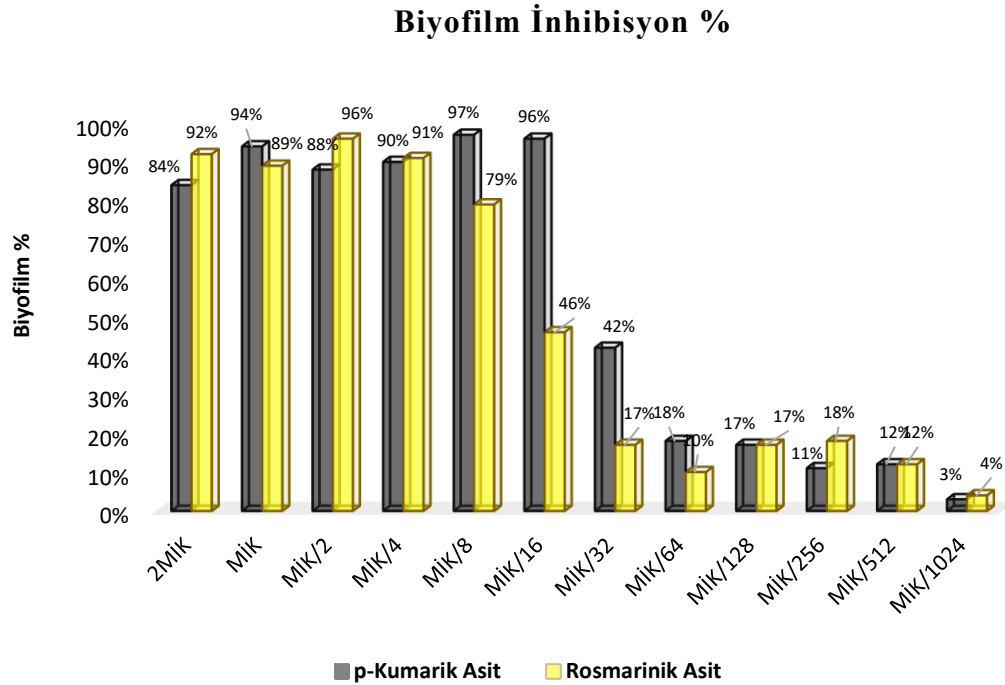


Şekil 11. *Thymus praecox subsp.skorpilii* var. *skorpilii* ve *Satureja cuneifolia*'nın *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Bitkisel ajanların *Klebsiella pneumoniae* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon oranları

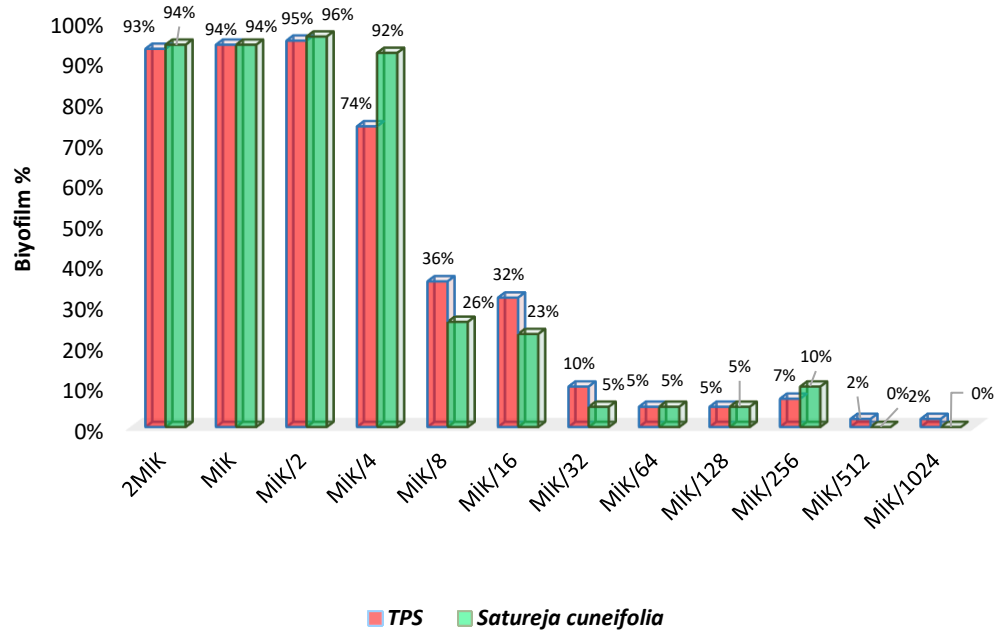


Şekil 12. Malik asit ve Tannik asitin *Klebsiella pneumoniae* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması



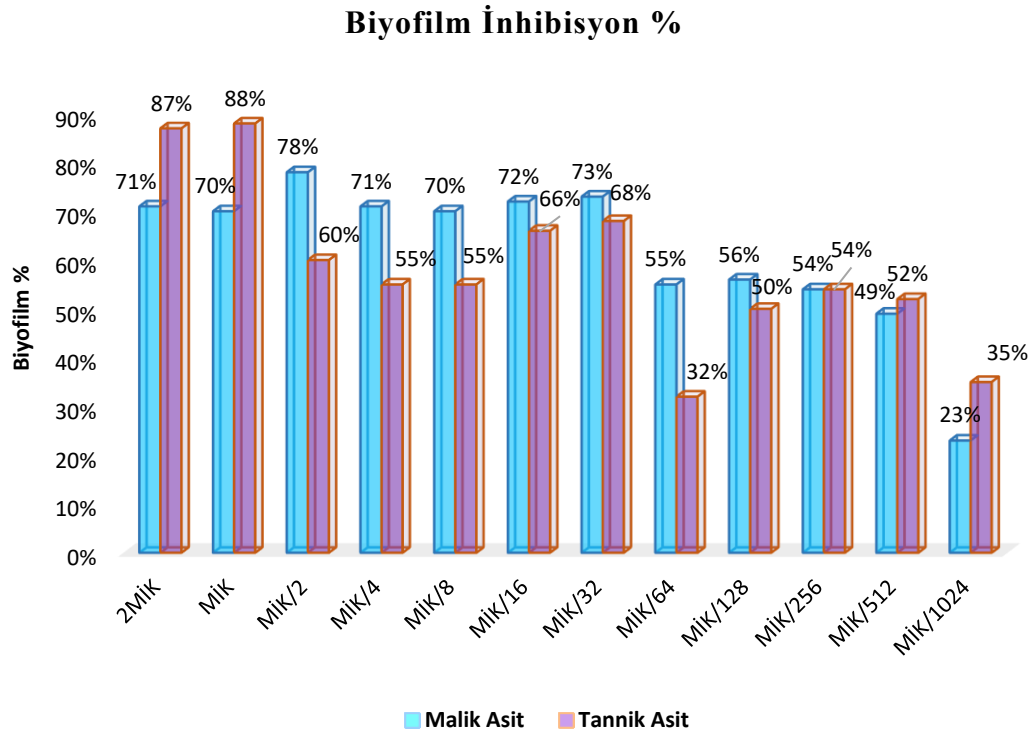
Şekil 13 p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin *Klebsiella pneumoniae* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Biyofilm İnhibisyon %

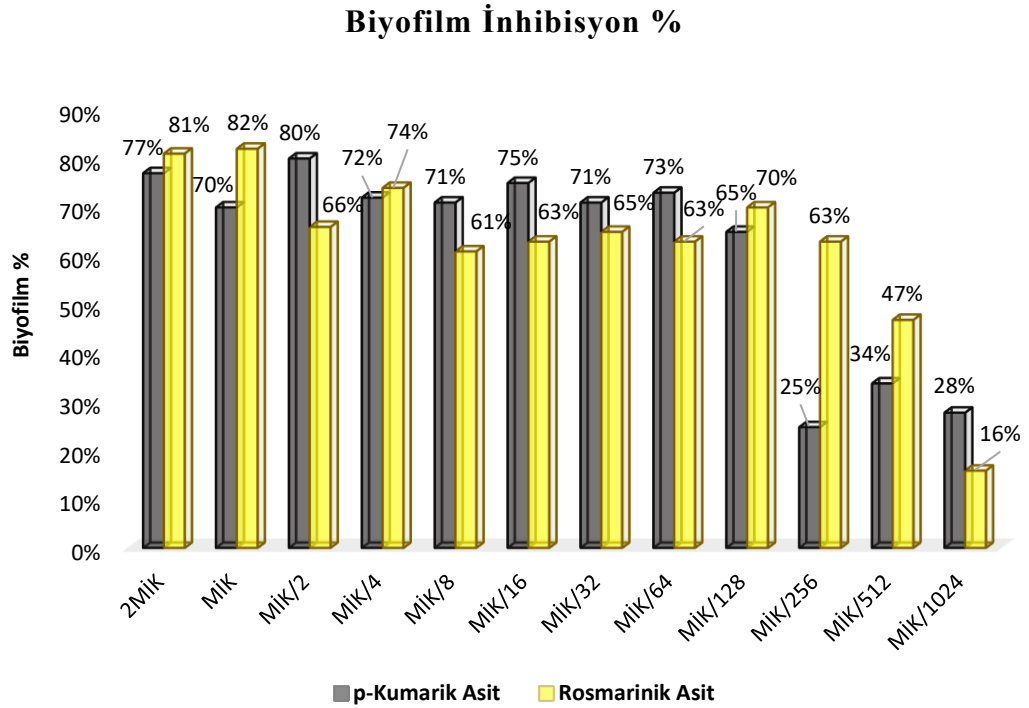


Şekil 14. *Thymus praecox subsp.skorpilii* var. *skorpilii* ve *Satureja cuneifolia*'nın *Klebsiella pneumoniae* klinik üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Bitkisel ajanların MRSA suşu üzerine biyofilm inhibisyon oranları

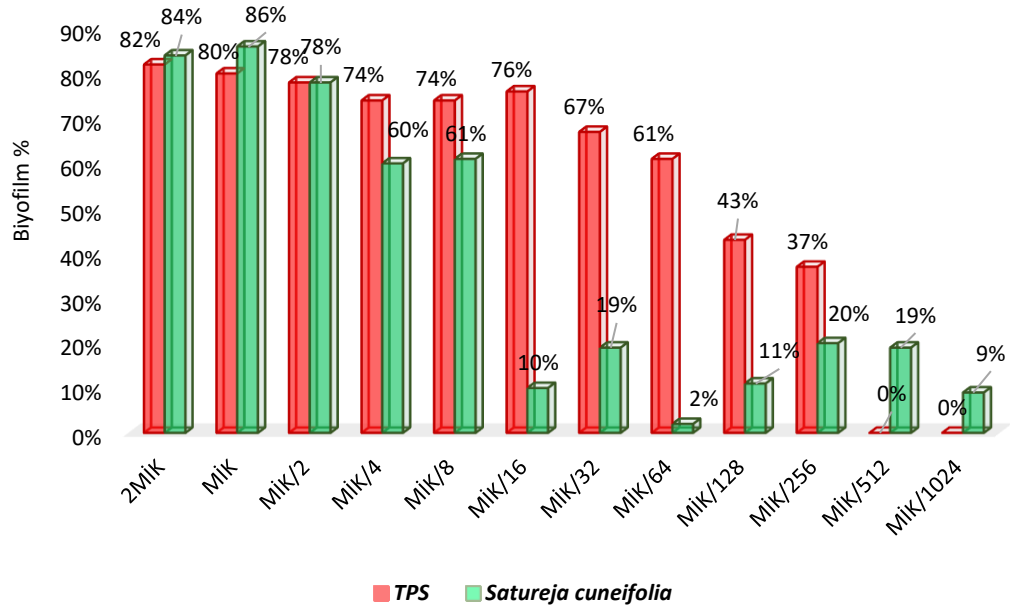


Şekil 15. Malik asit ve Tannik asitin MRSA klinik üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması



Şekil 16. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin MRSA klinik üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

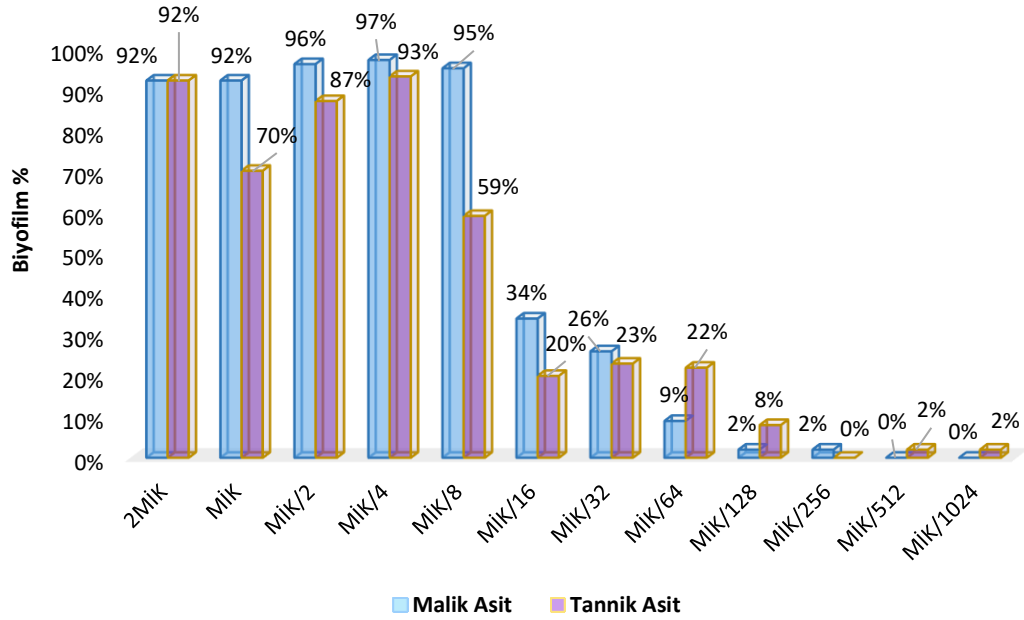
Biyofilm İnhibisyon %



Şekil 17. *Thymus praecox subsp.skorpilii* var. *skorpilii* ve *Satureja cuneifolia*'nın MRSA klinik üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

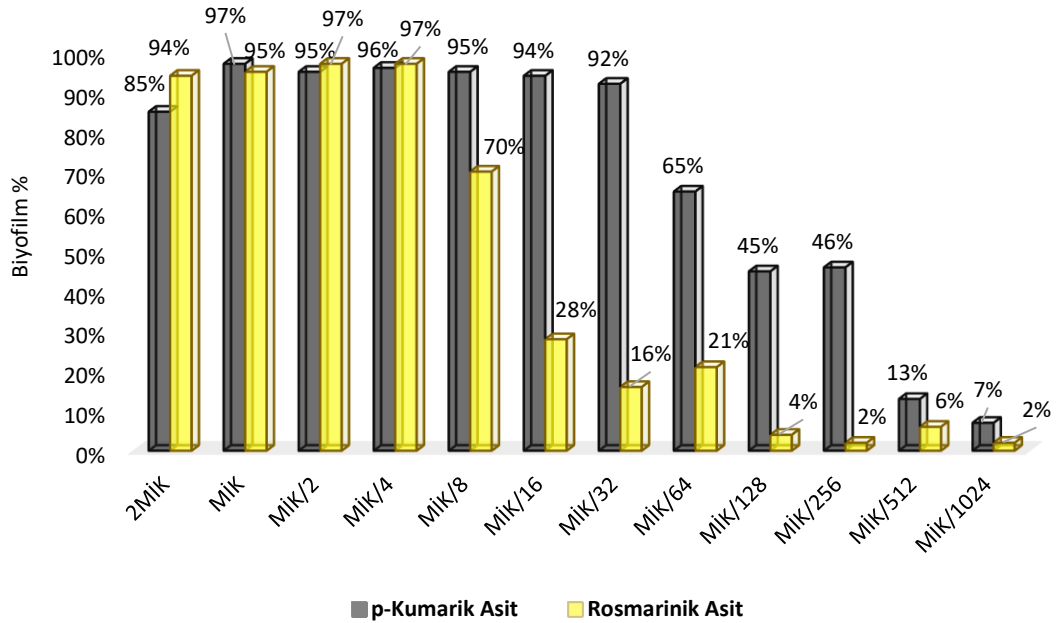
Bitkisel ajanların *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu üzerine biyofilm inhibisyon oranları

Biyofilm İnhibisyon %



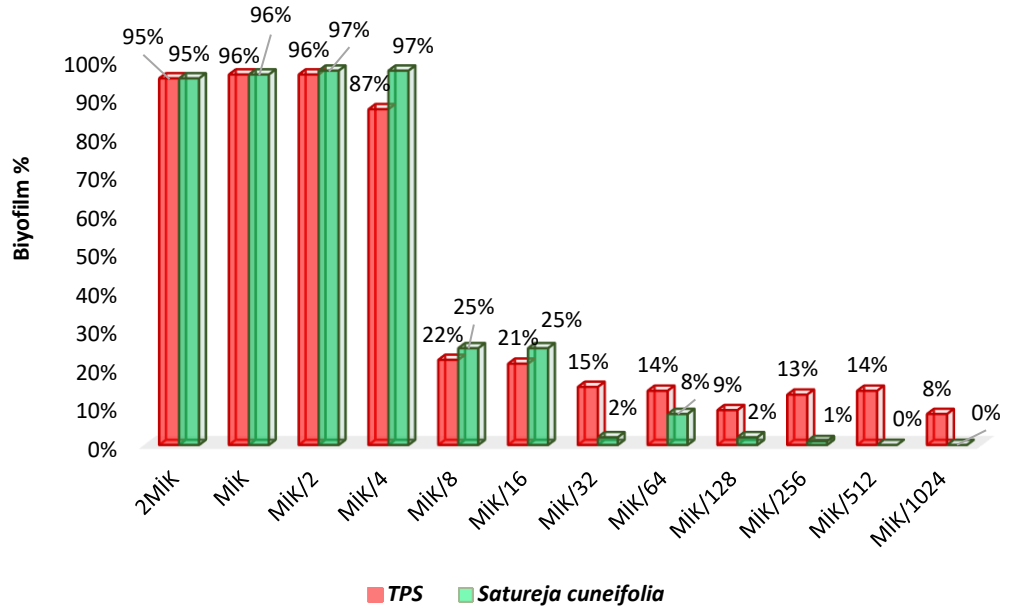
Şekil 18. Malik asit ve Tannik asitin *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Biyofilm İnhibisyon %



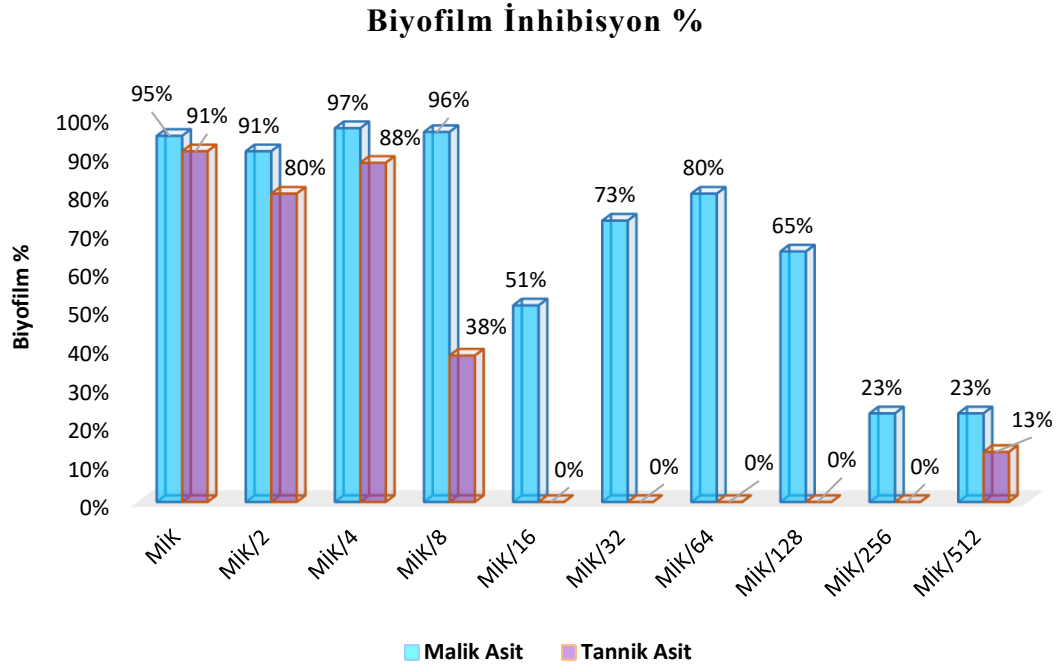
Şekil 19. p-Kumarik asit ve rosmarinik asitin *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Biyofilm İnhibisyon %

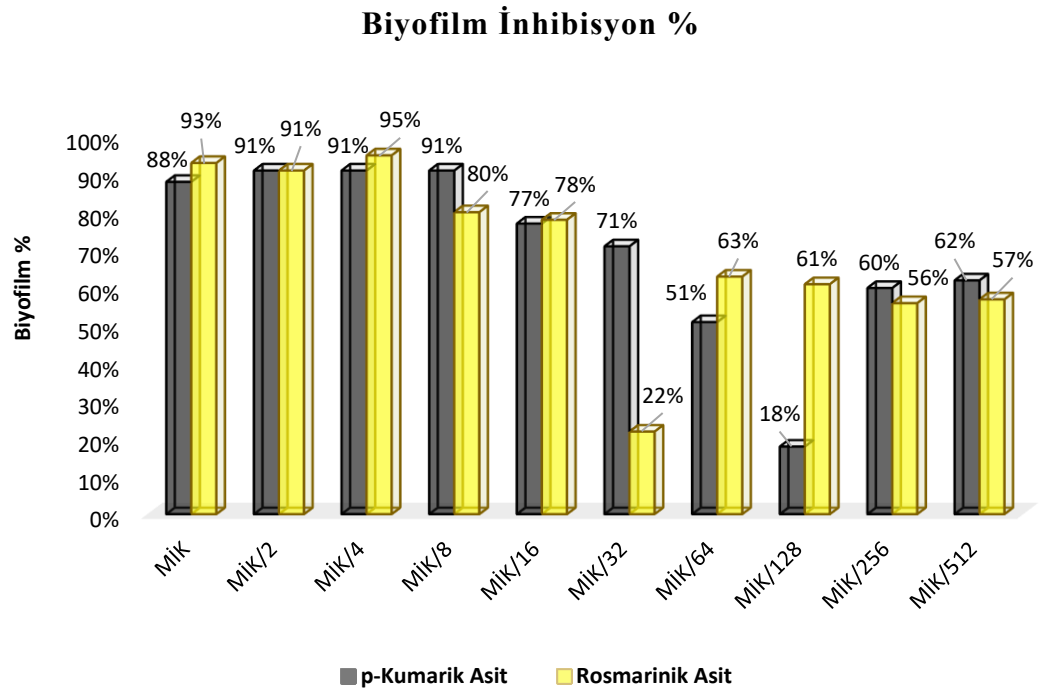


Şekil 20. *Thymus praecox subsp.skorpilii* var. *skorpilii* ve *Satureja cuneifolia*'nın *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Bitkisel ajanların *Pseudomonas aeruginosa* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon oranları

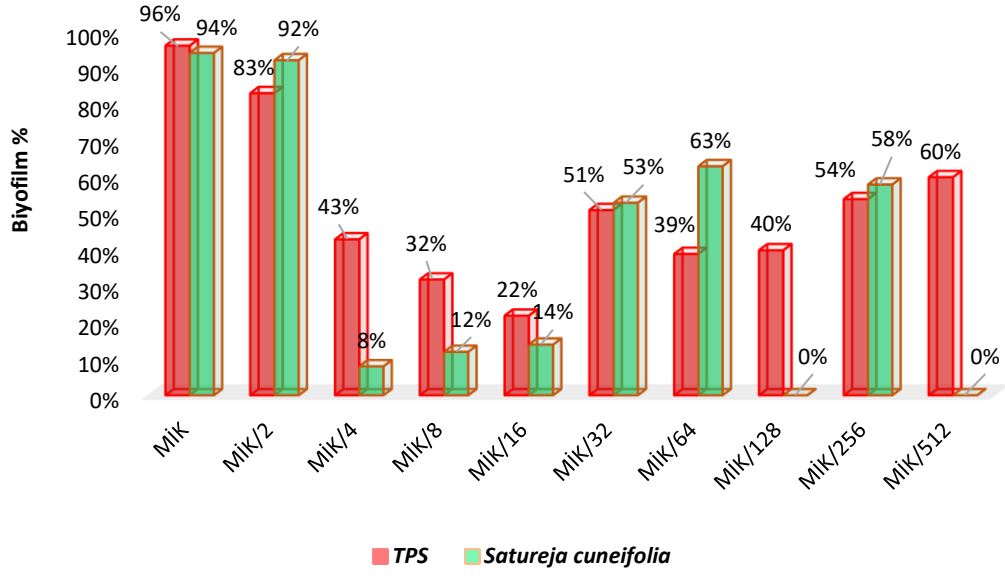


Şekil 21. Malik asit ve Tannik asitin *Pseudomonas aeruginosa* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması



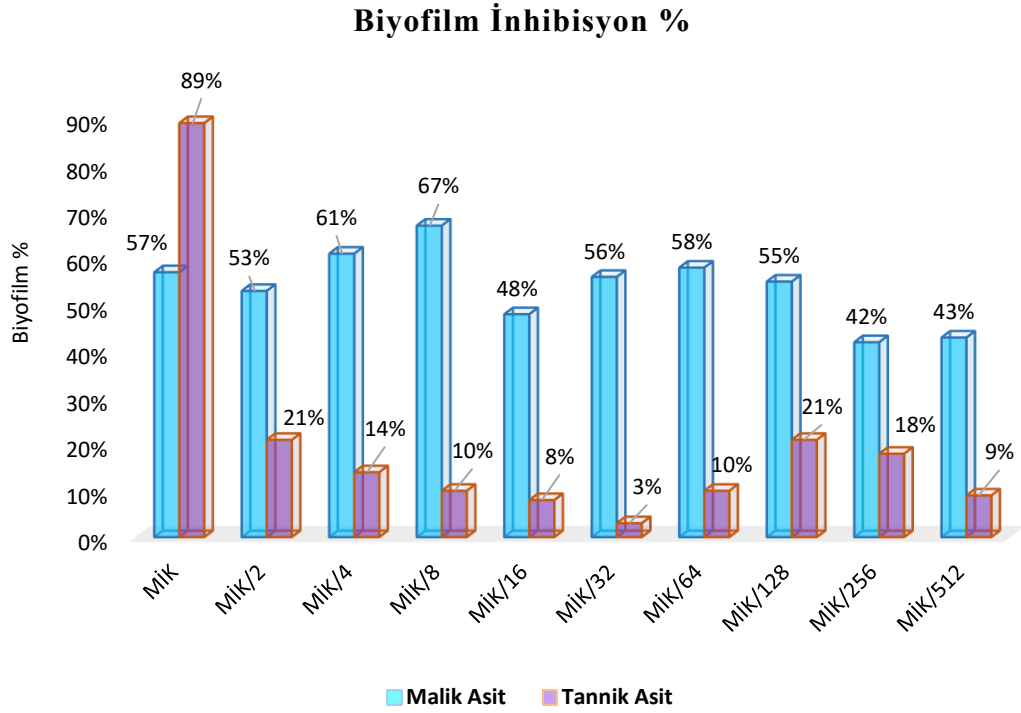
Şekil 22. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin *Pseudomonas aeruginosa* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Biyofilm İnhibisyon %

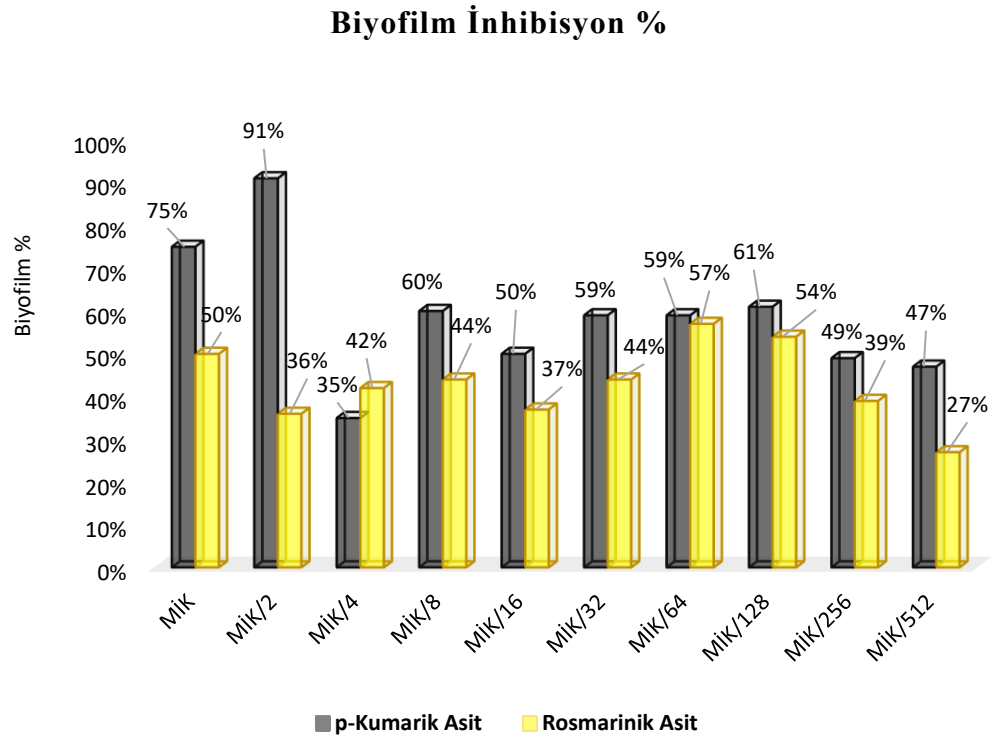


Şekil 23. *Thymus praecox subsp.skorpilii* var. *skorpilii* ve *Satureja cuneifolia*'nın *Pseudomonas aeruginosa* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

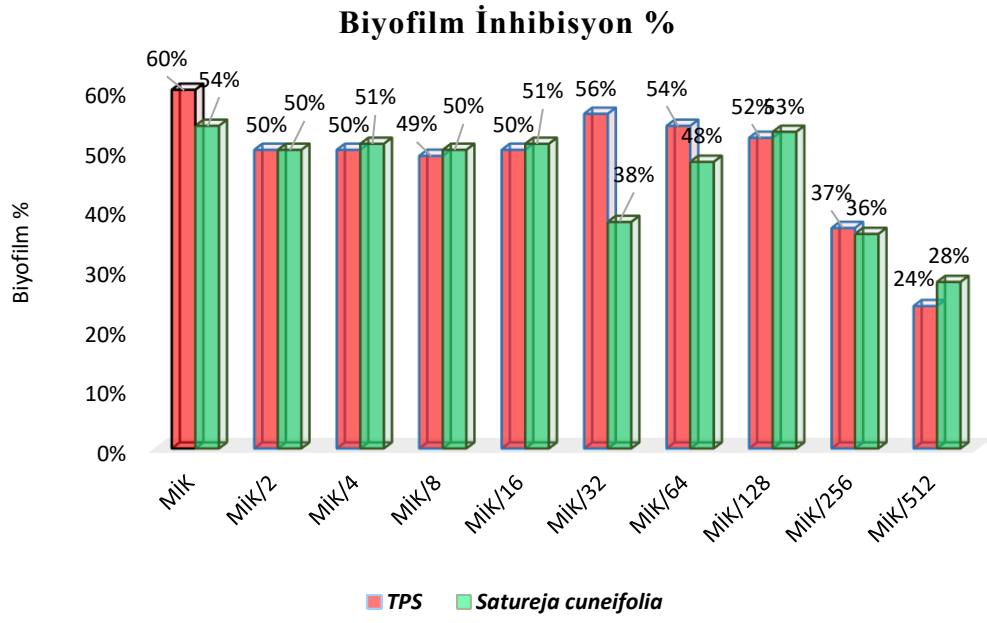
Bitkisel ajanların *E.coli* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon oranları



Şekil 24. Malik asit ve Tannik asitin *Escherichia coli* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması



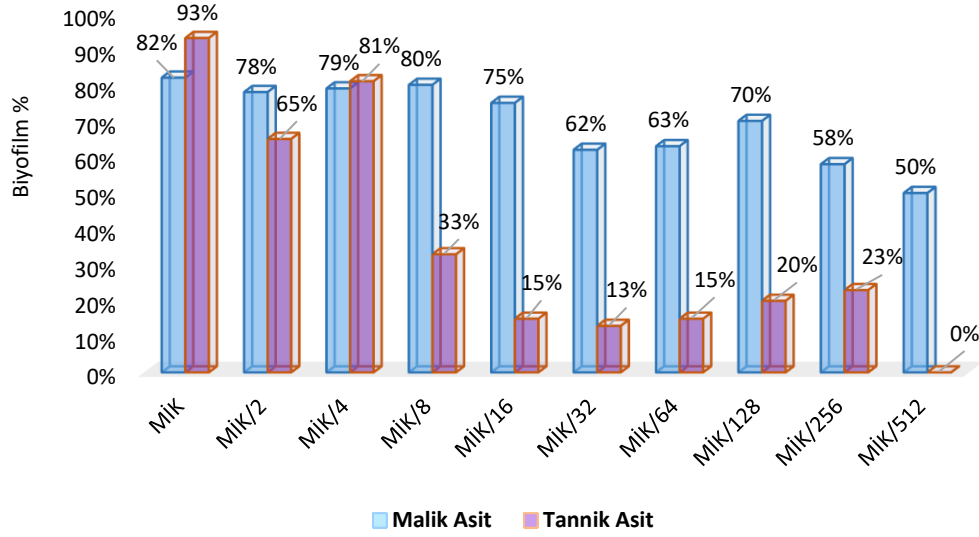
Şekil 25. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin *Escherichia coli* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması



Şekil 26. *Thymus praecox subsp.skorpilii* var. *skorpilii* ve *Satureja cuneifolia*'nın *Escherichia coli* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

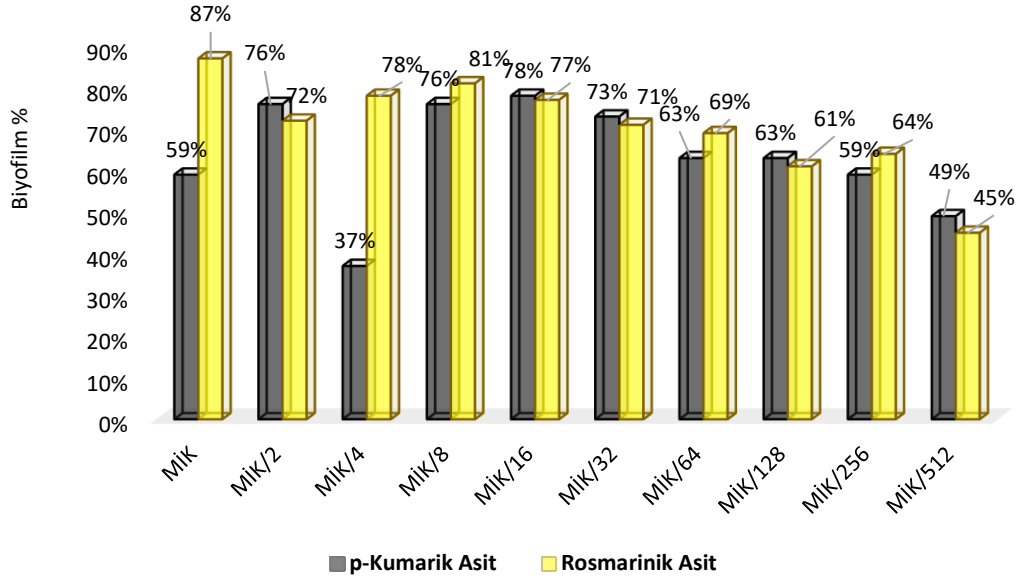
Bitkisel ajanların *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu üzerine biyofilm inhibisyon oranları

Biyofilm İnhibisyon %



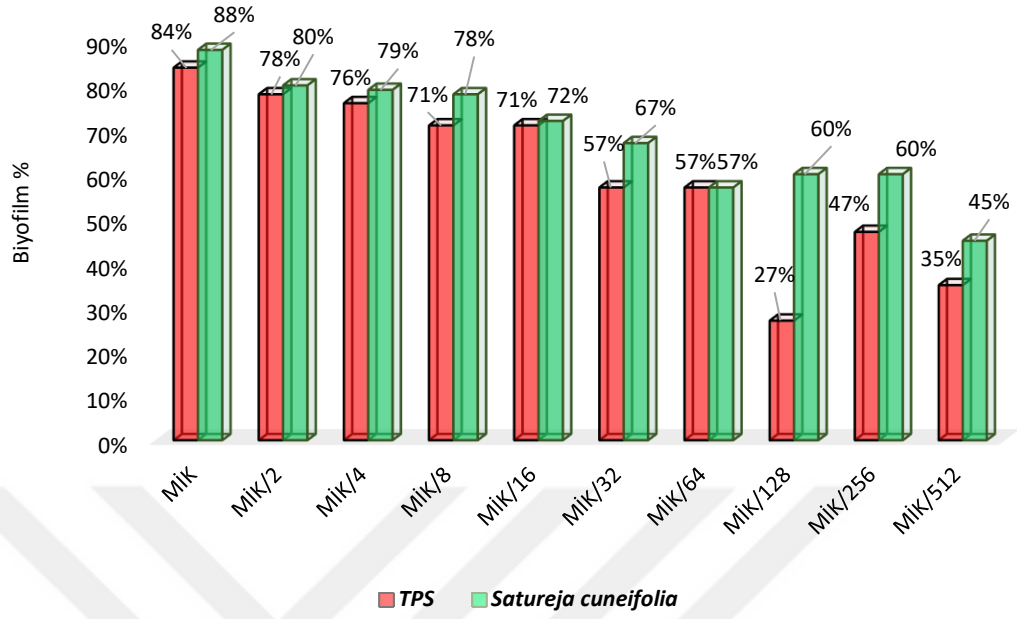
Şekil 27. Malik asit ve Tannik asitin *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Biyofilm İnhibisyon %



Şekil 28. p-Kumarik asit ve rosmarinik asitin *Escherichia coli* ATCC 25922 üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

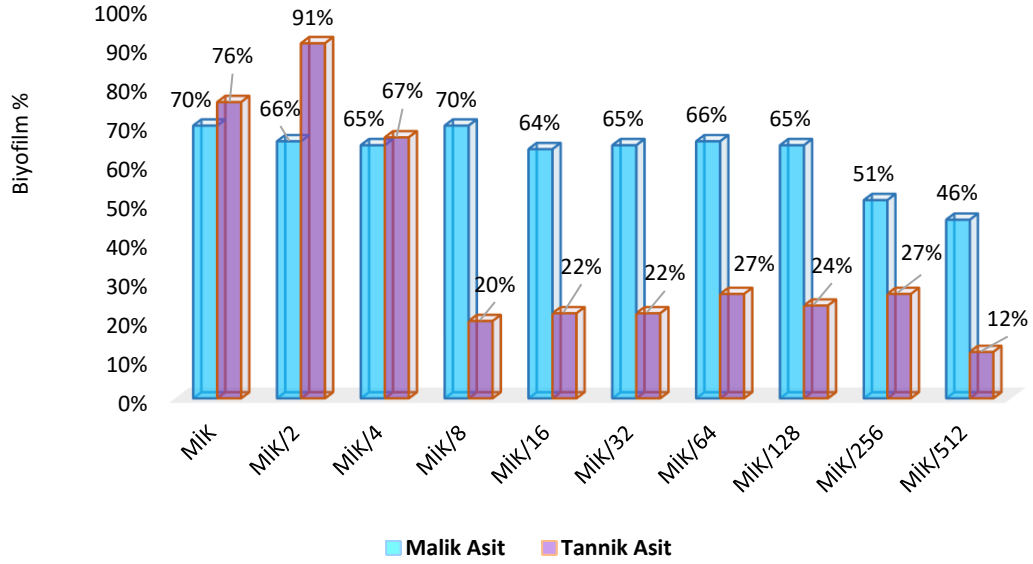
Biyofilm İnhibisyon %



Şekil 29. *Thymus praecox subsp.skorpilii* var. *skorpilii* ve *Satureja cuneifolia*'nın *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

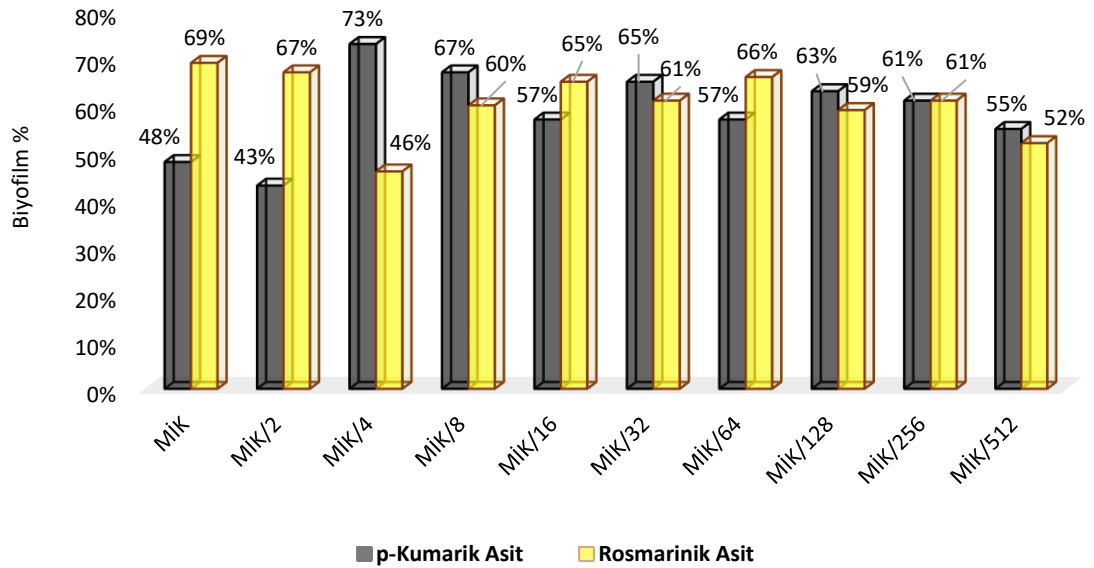
Bitkisel ajanların *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşu üzerine biyofilm inhibisyon oranları

Biyofilm İnhibisyon %



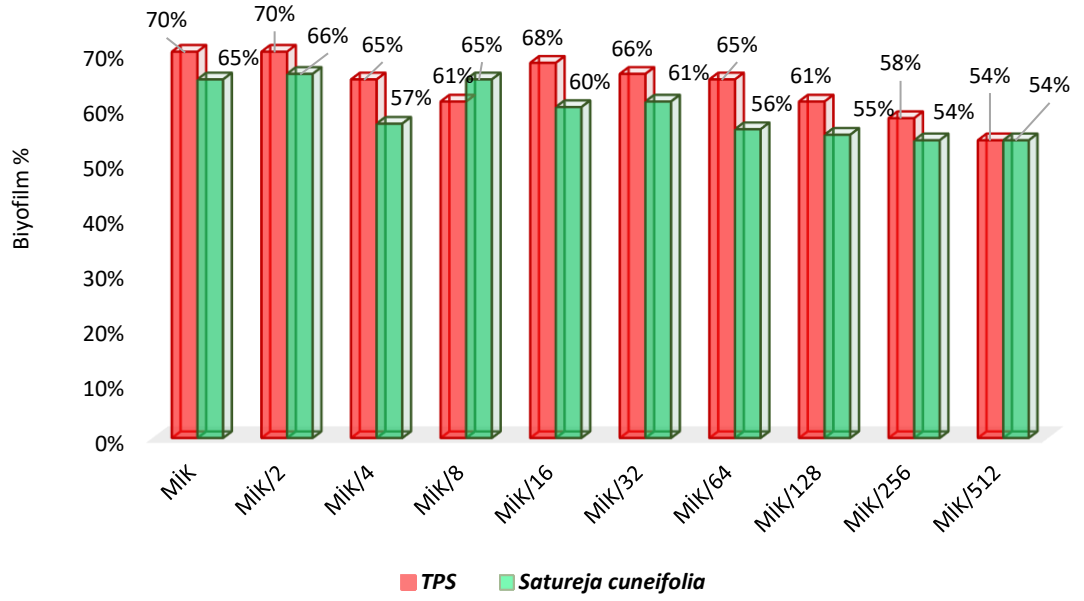
Şekil 30. Malik asit ve Tannik asitin *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Biyofilm İnhibisyon %



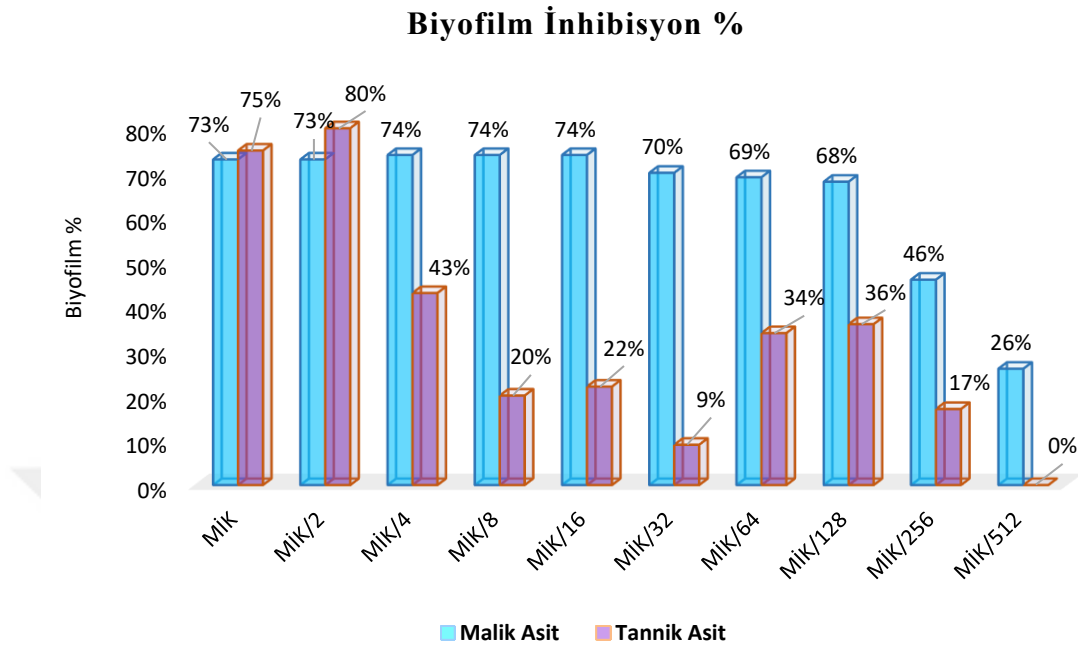
Şekil 31. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Biyofilm İnhibisyon %

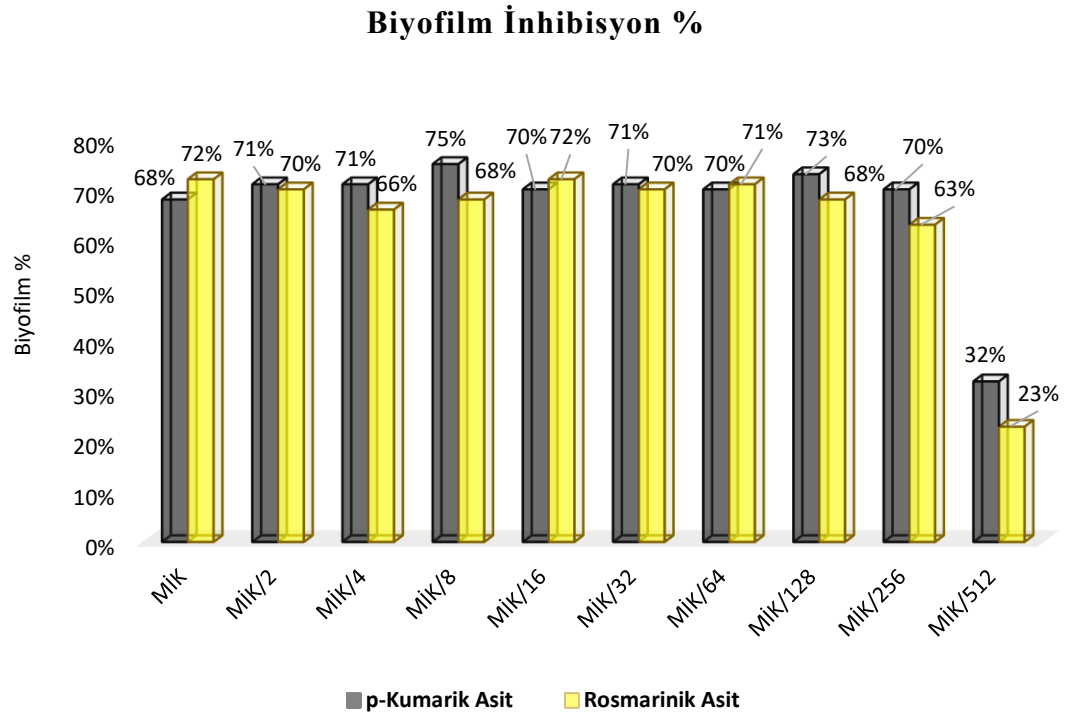


Şekil 32. *Thymus praecox subsp.skorpilii* var. *skorpilii* ve *Satureja cuneifolia*'nın *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Bitkisel ajanların *Salmonella typhimurium* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon oranları

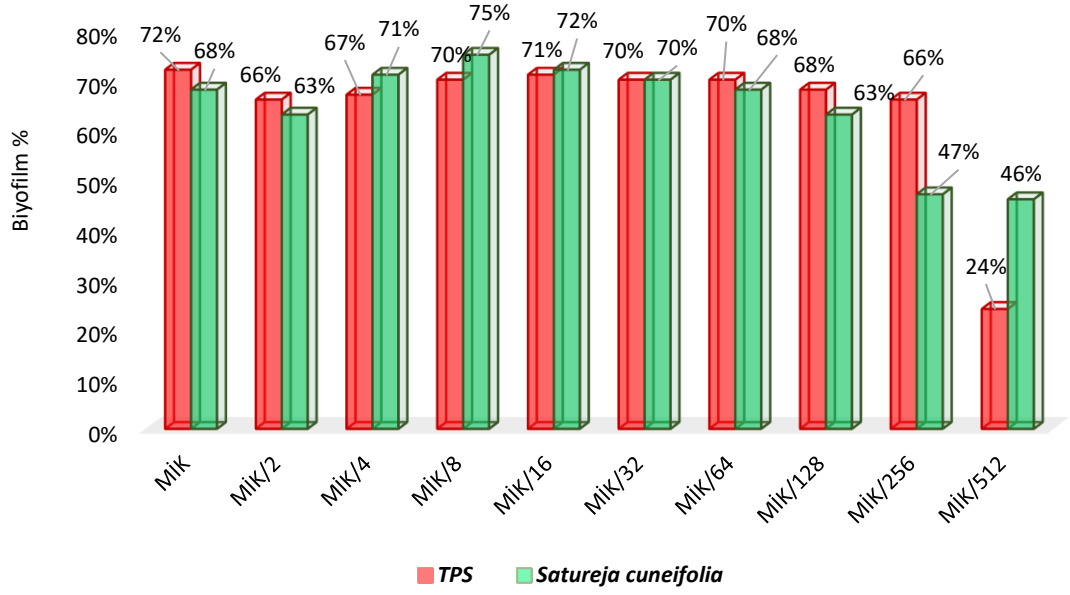


Şekil 33. Malik asit ve Tannik asitin *Salmonella typhimurium* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması



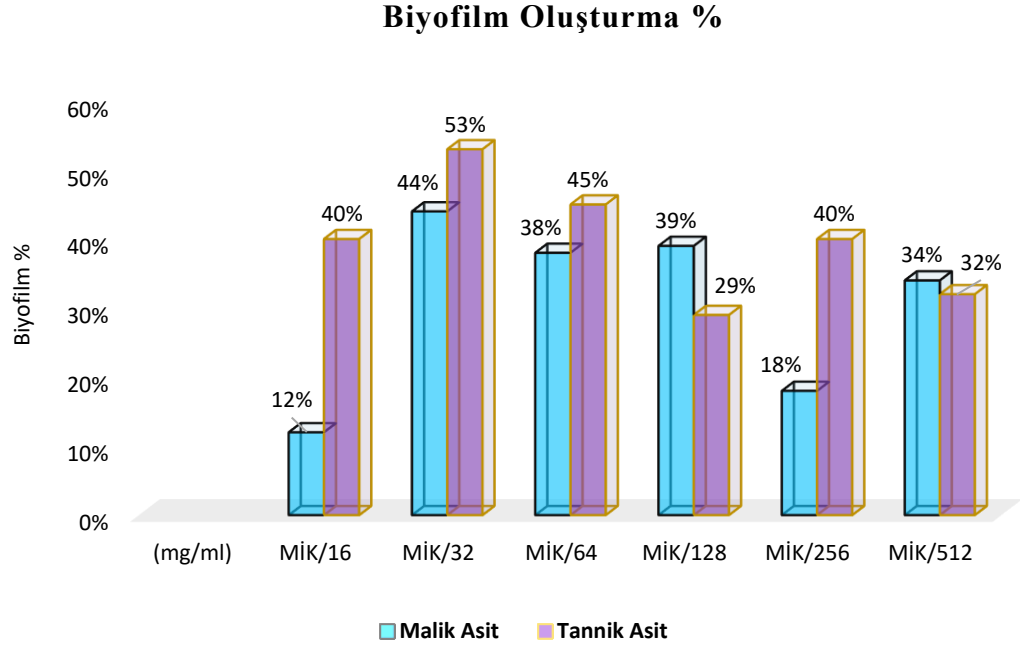
Şekil 34. p-Kumarik asit ve Rosmarinik asitin *Salmonella typhimurium* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Biyofilm İnhibisyon %

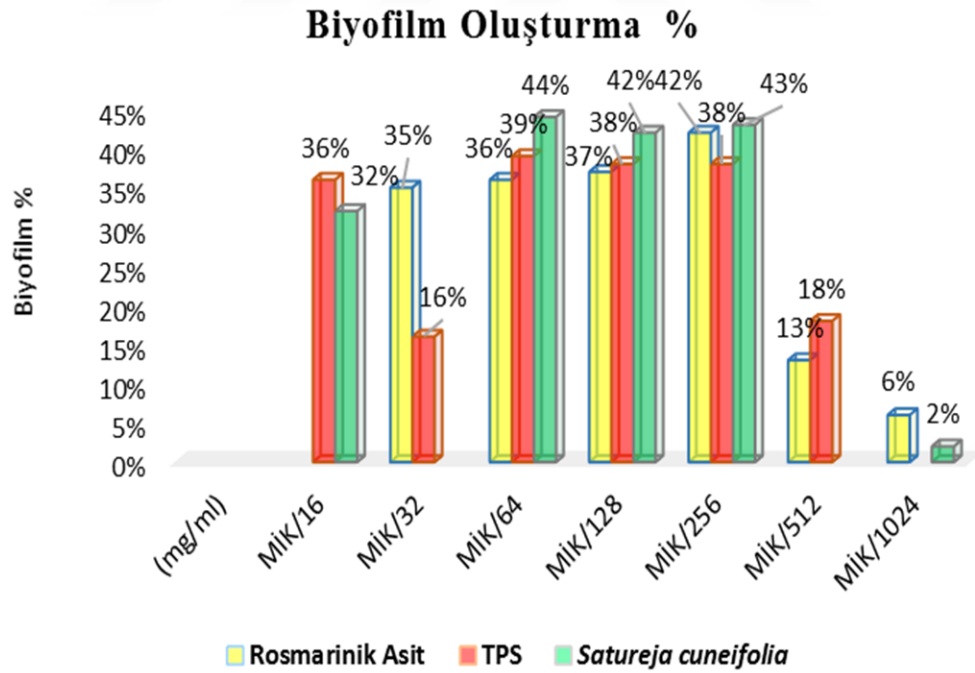


Şekil 35. *Thymus praecox subsp.skorpilii var. skorpilii* ve *Satureja cuneifolia*'nın *Salmonella typhimurium* klinik suşu üzerine biyofilm inhibisyon sonuçlarının karşılaştırılması

Bitkisel ajanların *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 suşu üzerine biyofilm oluşturma oranları



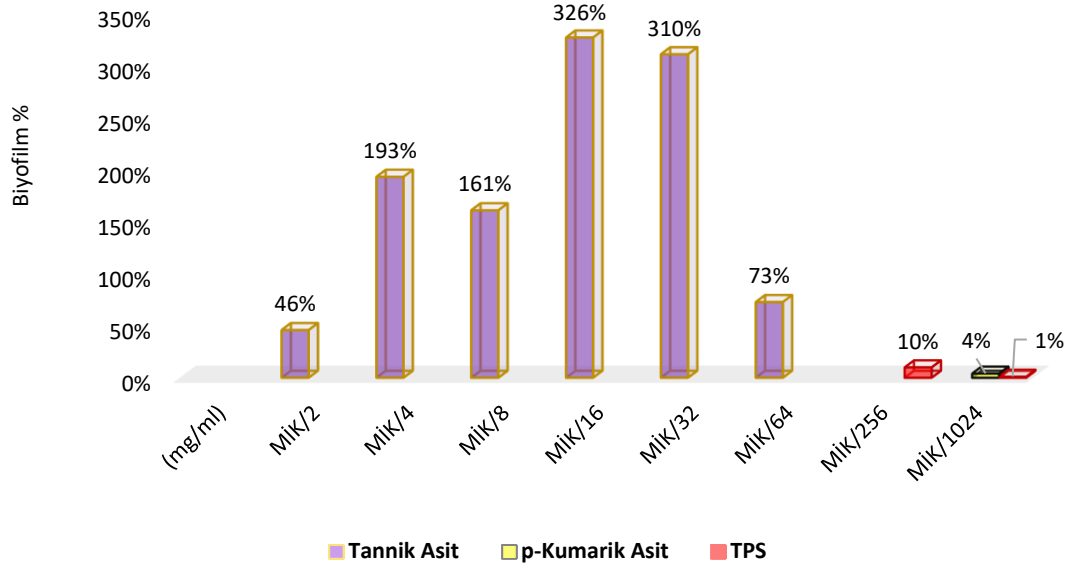
Şekil 36. Malik asit ve tannik asitin *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması



Şekil 37. Rosmarinik asit, *Thymus praecox subsp. skorpilii* var. *skorpilii*, *Satureja cuneifolia*'nın *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması

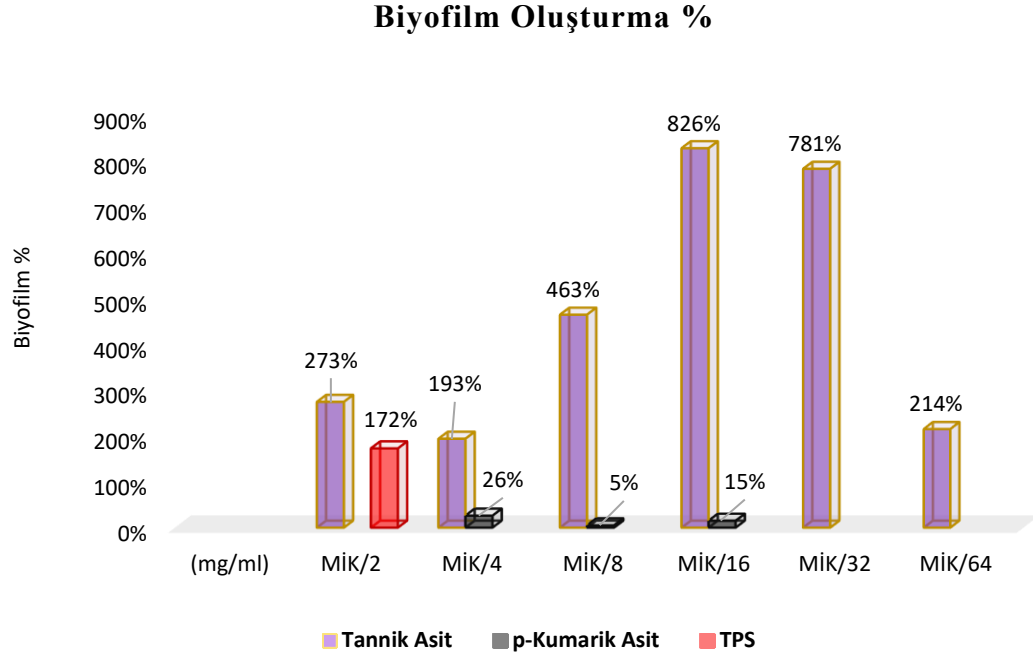
Bitkisel ajanların *Bifidobacterium spp.* suşu üzerine biyofilm oluşturma oranları

Biyofilm Oluşturma %



Şekil 38. Tannik asit, p-Kumarik asit ve *Thymus praecox subsp.skorpilii* var. *skorpilii* 'nin *Bifidobacterium spp.* suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması

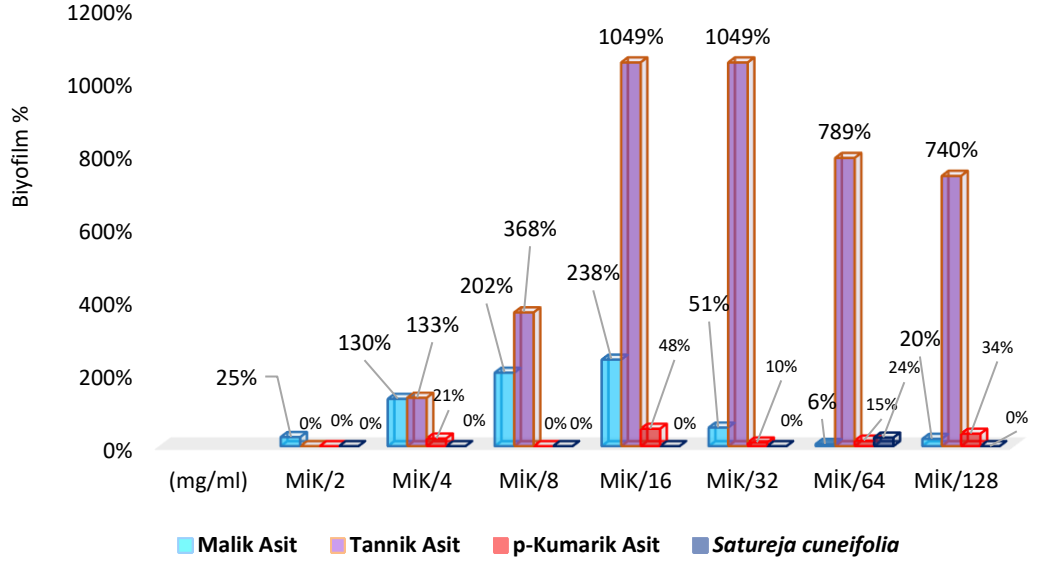
Bitkisel ajanların *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 suşu üzerine biyofilm oluşturma oranları



Şekil 39. Tannik asit, p-Kumarik asit ve *Thymus praecox subsp.skorpilii* var. *skorpilii*'nin *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması

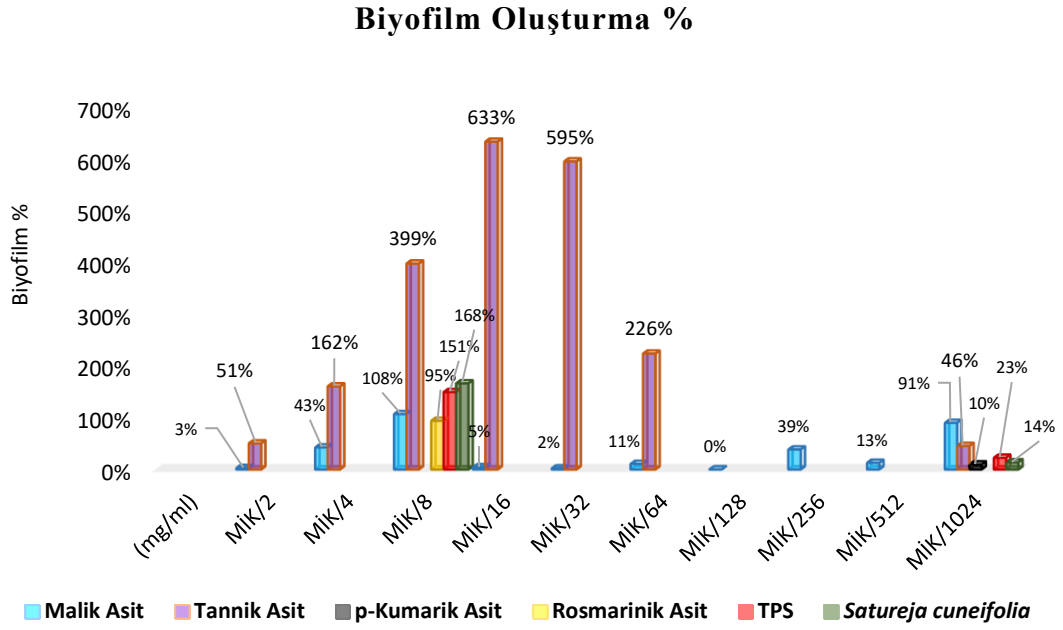
Bitkisel ajanların *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931 suşu üzerine biyofilm oluşturma oranları

Biyofilm Oluşturma %



Şekil 40. Malik asit, Tannik asit, p-Kumarik asit ve *Satureja cuneifolia*'nın *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması

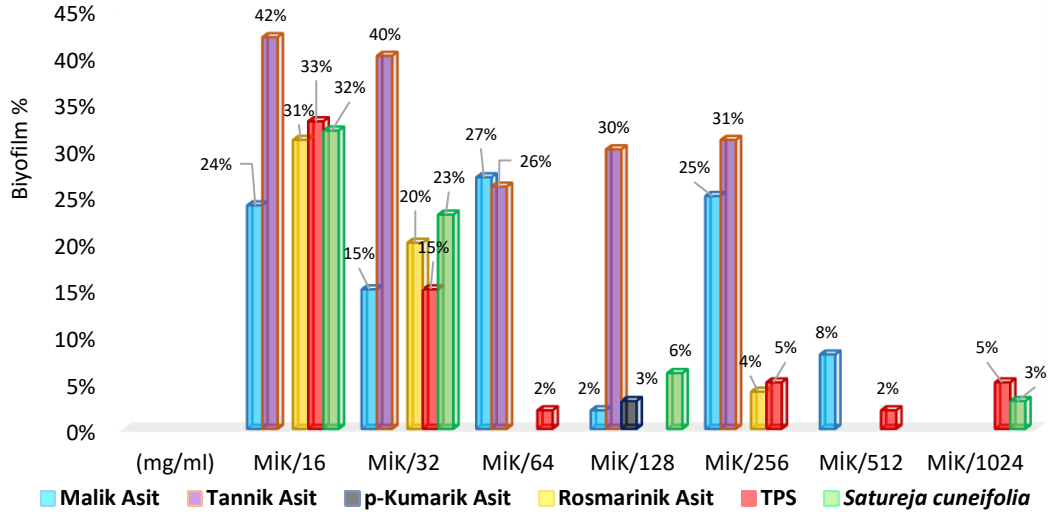
Bitkisel ajanların *E.faecium* suşu üzerine biyofilm oluşturma oranları



Şekil 41. Malik asit, Tannik asit, p-Kumarik asit, Rosmarinik asit, *Thymus praecox subsp. skorpilii* var. *skorpilii* ve *Satureja cuneifolia*'nın *Enterococcus faecium* suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması

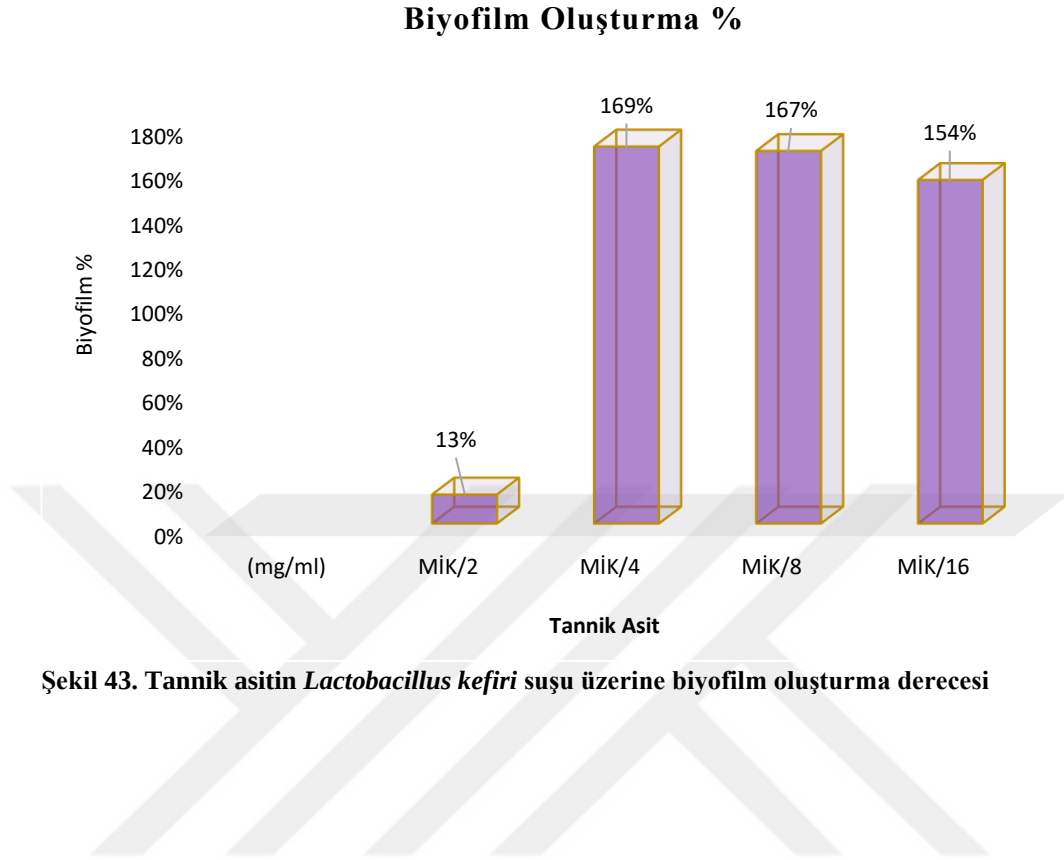
Bitkisel ajanların *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşu üzerine biyofilm oluşturma oranları

Biyofilm Oluşturma %



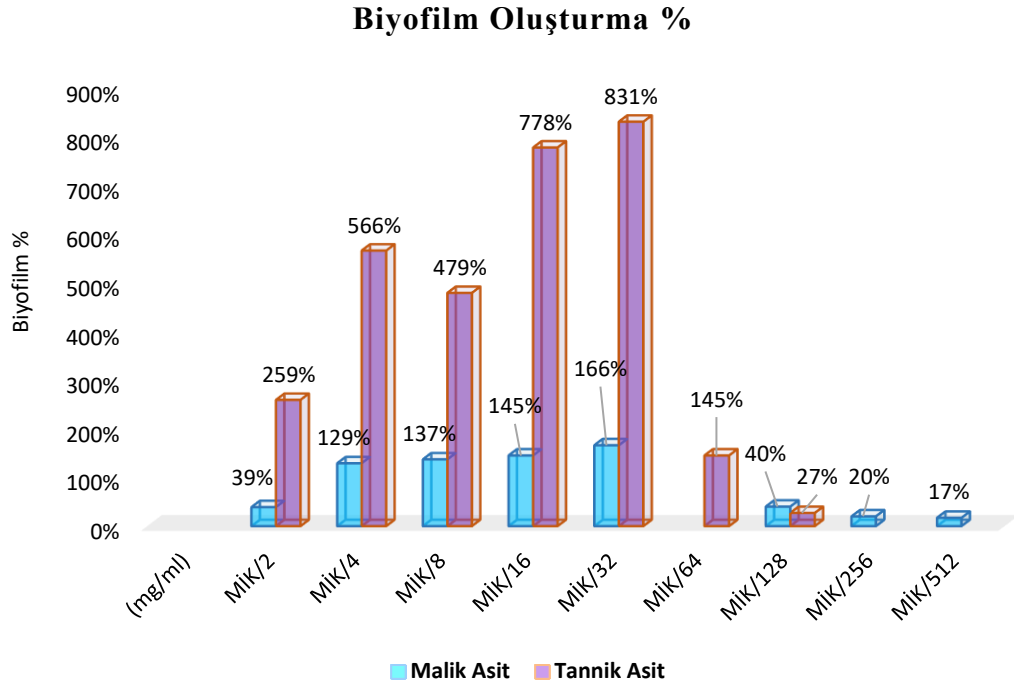
Şekil 42. Malik asit, Tannik asit, p-Kumarik asit, Rosmarinik asit, *Thymus praecox subsp. skorpilii* var. *skorpilii* ve *Satureja cuneifolia*'nın *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması

Bitkisel ajanların *Lactobacillus kefir* suşu üzerine biyofilm oluşturma oranları

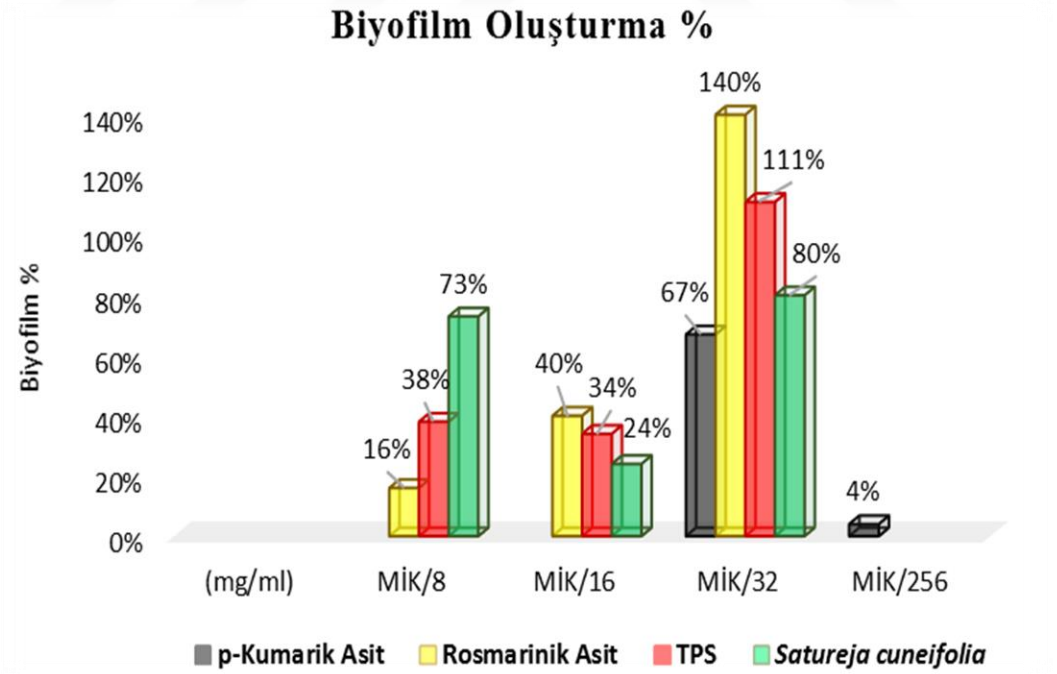


Şekil 43. Tannik asitin *Lactobacillus kefir* suşu üzerine biyofilm oluşturma derecesi

Bitkisel ajanların *Lactobacillus plantarum* suşu üzerine biyofilm oluşturma oranları

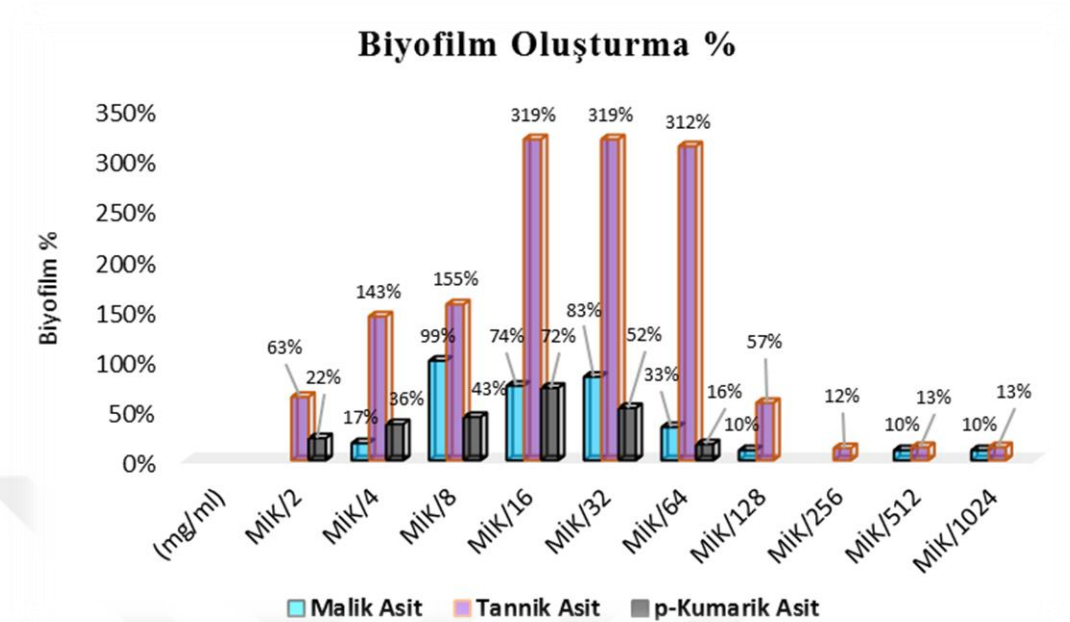


Şekil 44. Malik asit,tannik asitin *Lactobacillus plantarum* suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması

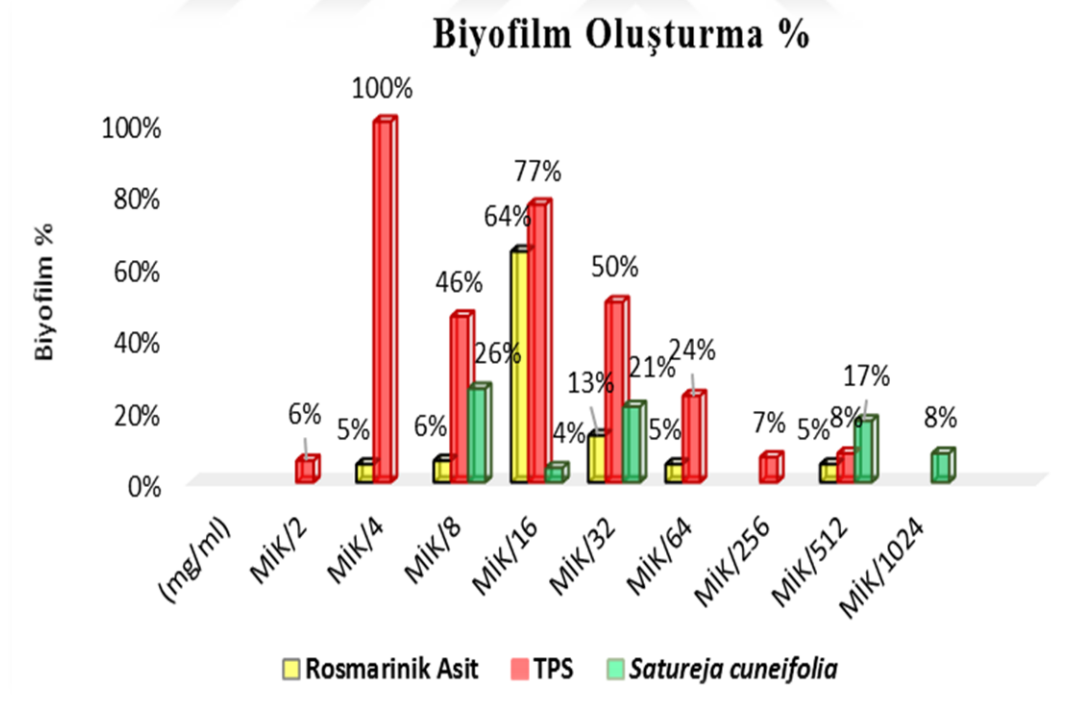


Şekil 45. p-Kumarik asit,Rosmarinik asit, *Thymus praecox subsp.skorpilii* var. *skorpilii*, *Satureja cuneifolia*'nın *Lactobacillus plantarum* suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması

Bitkisel ajanların *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 suşu üzerine biyofilm oluşturma oranları



Şekil 46. Malik asit, Tannik asit, p-Kumarik asitin *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması



Şekil 47. Rosmarinik asit, *Thymus praecox subsp. skorpilii* var. *skorpilii*, *Satureja cuneifolia*'nın *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 suşu üzerine biyofilm oluşturma sonuçlarının karşılaştırılması

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan biyoaktif maddelerdir. Ancak antibiyotiklerin yanlış kullanımı ve sentetik kökenli olmaları ile yan etkilerinin olması araştırmacıları doğal kaynaklı antimikrobiyal ajanlara yönlendirmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda bitkisel ajanların antibakteriyel, antibiyofilm ve antioksidan potansiyele sahip olduğu ve çeşitli metabolitler ürettiği bildirilmiştir. Bilindiği gibi bitki ekstraktları ve saf fenolik bileşiklerin temel olarak insanlarda rahatsızlıkları kontrol eden iyileştirici bileşenleri veya araçları teşvik ettiği ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla çalışmamızda, bitki ekstraktları (*Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii* 'yi (TPS) ile *Satureja cuneifolia*) ve saf fenolik bileşiklerin (rosmarinik asit, malik asit, tannik asit, p-Kumarik asit ve)probiyotikler ve patojen mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktivitesi ile bu mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasitesi üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmamızda 5 adet klinik patojen, 5 adet standart patojen, 5 adet probiyotik ürün ve çeşitli eczane, market ev yapımı ürünlerinden izole edilen probiyotik mikroorganizma ve 5 adet standart probiyotik mikroorganizma kullanıldı.

Taşkın ve arkadaşları 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada metanol ile çözdürülen *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii* 'yi (TPS) *S. aureus* ATCC 25923 üzerine in vitro koşullarda antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmacılar TPS'nin *S. aureus* suşuna karşı (zon çapı: 10,24 mm; MİK 5 mg / ml) antibakteriyel aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda DMSO ile çözdürülen TPS'nin MRSA klinik izolatına karşı (zon çapı: 19,07 mm; MIC: 2,60 mg / ml) antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlemlendi. Bu sonuçlara dayanarak oluşan farklılıklar kullanılan madde konsantrasyonu, mikroorganizma tür farkı, difüze olan madde miktarının değişikliği, ekstrenin çözdürüldüğü çözücü kimyasalından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Öke ve ark., 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada *Satureja cuneifolia* türünün esansiyal yağlarının enfeksiyon etkeni *E.coli* O157: H7 ve *P. aeruginosa* ATCC 29212 suşları üzerine in vitro koşullar altında antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *Satureja cuneifolia*'nın *E.coli* O157: H7 suşuna karşı (zon çapı: 13 mm; MİK: 600 µg/mL) ve *P. aeruginosa* ATCC 29212 suşuna karşı (zon çapı: 7 mm; MİK: 1400 µg/mL) antibakteriyel aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada kullanılan DMSO ile çözdürülen *Satureja cuneifolia* ekstresinin *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı (zon çapı: 14,13 mm; MİK: 5.21 mg / ml) *P. aeruginosa* klinik suşuna karşı (zon çapı: 12,36 mm; MİK: 2.60 mg / ml) ve antibakteriyel aktivite sergilediği gözlemlendi. Bu sonuçlara dayanarak oluşan farklılıklar kullanılan madde konsantrasyonu, uçucu yağ yerine ekstre kullanımı, mikroorganizma farkı, difüze olan madde miktarının değişikliği, bitkinin yetiştiği ortam, iklim farklılığı, bitkilerin ekstraksiyon yöntemleri ve ekstrenin çözündürüldüğü çözücü kimyasalından kaynaklandığı düşüncesindeyiz.

Ekambaram ve ark., 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada metanol ile çözdürülen rosmarinik asitin agar difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi ile enfeksiyon etkenleri *S.aureus* ATCC 25923 ve MRSA klinik izolat üzerine in vitro koşullar altında antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda rosmarinik asitin *S.aureus* ATCC 25923 suşuna karşı (zon çapı: 12 mm; MİK: 0.8 mg/ml) ve MRSA klinik izolat suşuna karşı (zon çapı: 11 mm; MİK: 10 mg/ml) antibakteriyel aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak DMSO ile çözdürülen rosmarinik asitin *S. aureus* ATCC 43300 suşuna karşı (zon çapı: 10,11 mm; MİK: 1 mg / ml) MRSA klinik izolatına karşı (zon çapı: 9,75 mm; MİK: 8,03 mg / ml) antibakteriyel aktivite sergilediği gözlemlendi. Bu sonuçlara dayanarak oluşan ufak farklılıklar kullanılan madde konsantrasyonu, kullanılan yöntemin elde edilen sonuçları etkilemesi, mikroorganizma tür farkı, difüze olan madde miktarının değişikliği, saf fenolik bileşiğin çözündürüldüğü çözücü kimyasalından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Allı., 2016 yılında yapmış olduğu çalışmada DMSO ile çözdürülen sumak ekşisinden doğal olarak elde edilen malik asitin enfeksiyon etkeni *S.aureus* 6538 ve *E. coli* DM suşları üzerine in vitro koşullar altında antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda rosmarinik asitin *S.aureus* 6538 suşuna karşı (zon çapı: 18 mm) ve *E.coli* DM suşuna karşı (zon çapı: 19 mm) antibakteriyel aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada kullanılan etanol ile çözdürülen malik asitin *S. aureus* ATCC 43300 suşuna karşı (zon çapı: 22,28 mm) *E.coli* klinik izolat suşuna karşı (zon çapı: 19,36 mm) ve antibakteriyel aktivite sergilediği gözlemlendi. Bu sonuçlara dayanarak oluşan farklılıklar kullanılan madde konsantrasyonu, kullanılan yöntemin elde edilen sonuçları etkilemesi, mikroorganizma farkı, difüze olan madde miktarının değişikliği, saf fenolik bileşiğin çözüldürüldüğü çözücü kimyasalından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kim ve arkadaşları 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada metanol ile çözdürülen malik asitin enfeksiyon etkeni *E. coli* O157:H7 üzerine in vitro koşullar altında antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda malik asitin *E. coli* O157:H7 suşuna karşı (MİK; 4,2 mg/ ml) antibakteriyel aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada kullanılan etanol ile çözdürülen malik asitin *E.coli* ATCC 25922 suşuna karşı (MİK; 2,73 mg/ ml) antibakteriyel aktivite sergilediği gözlemlendi. Bu sonuçlara dayanarak oluşan farklılıklar kullanılan madde konsantrasyonu, kullanılan yöntemin elde edilen sonuçları etkilemesi, mikroorganizma farkı, saf fenolik bileşiğin çözüldürüldüğü çözücü kimyasalından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca çalışmada yer alan malik asitin metanol ekstresine kıyasla, etanol ekstresinde daha güçlü ve daha geniş antimikrobiyal spektruma sahip olduğu bu çalışma ile doğrulanmıştır.

Kim ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada tannik asitin enfeksiyon etkeni *S. typhimurium* 19585, *S. typhimurium* 14028, *E. coli* 35150 ve *E. coli* 43890 suşları üzerine in vitro koşullar altında antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda tannik asitin *S. typhimurium* 19585 (zon çapı: 14 mm), *S. typhimurium* 14028 (zon çapı: 14 mm), *E. coli* 35150 (zon çapı: 15 mm), *E. coli* 43890 (zon çapı:15 mm) suşlarına karşı antibakteriyel aktivite sergilediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda kullanılan tannik asitin *S. typhimurium* klinik izolat suşuna karşı (zon çapı: 15,04 mm), *E. coli* klinik izolat suşuna karşı (zon çapı: 15,43) antibakteriyel aktivite sergilediği gözlemlendi. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmalara uygunluk göstermektedir. Bu sonuçlara dayanarak oluşan ufak farklılıklar kullanılan madde konsantrasyonu, kullanılan yöntemin elde edilen sonuçları etkilemesi, mikroorganizma farkından kaynaklandığı kanısındayız.

Diniz-Silva ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada DMSO ile çözdürülen tannik asitin enfeksiyon etkeni *S.aureus* SA-1199B üzerine in vitro koşullarda antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmacılar tannik asitin *S.aureus* SA-1199B suşuna karşı (MİK; 512 µg / ml) antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmada kullanılan etanol ile çözdürülen tannik asitin *S. aureus* ATCC 43300 suşuna karşı (MİK; 1,30 mg/ ml) antibakteriyel aktivite gösterdiği saptandı. Bu sonuçlara dayanarak oluşan farklılıklar mikroorganizma farkı, sıvı besiyerinde difüze olan madde miktarının değişikliği, saf fenolik bileşiğin çözündürüldüğü çözücünden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kim ve arkadaşları 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada etanol ile çözdürülen tannik asitin enfeksiyon etkeni *E. coli* O157:H7 üzerine in vitro koşullarda antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda tannik asitin *E. coli* O157:H7 suşuna karşı (MİK; 2 mg/ ml) antibakteriyel aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada kullanılan etanol ile çözdürülen tannik asitin *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı (MİK; 1,30 mg/ ml) antibakteriyel aktivite sergilediği gözlemlendi. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmaları destekler niteliktedir. Bu sonuçlara dayanarak oluşan ufak farklılıklar mikroorganizma tür farkı, difüze olan madde miktarının değişikliği, , saf fenolik bileşiğin çözündürüldüğü çözücü farkından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Koç ve arkadaşları 2014 yılında yapmış oldukları çalışmada DMSO ile çözdürülen Kumarin / p-Kumarik asit kombinasyonunun enfeksiyon etkeni *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşları üzerine in vitro koşullar altında antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda

DMSO ile çözdürülen Kumarin / p-Kumarik asit kombinasyonunun *S. aureus* ATCC 25923 (zon çapı: 10 mm), *E. coli* ATCC 25922 (zon çapı: 9 mm), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (zon çapı: 8 mm) suşlarının antibakteriyel aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada kullanılan etanol ile çözdürülen p-Kumarik asitin *S. aureus* ATCC 43300 suşuna karşı (zon çapı: 9.24 mm), *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı (zon çapı: 9.20 mm), *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşuna karşı (zon çapı: .871 mm) antibakteriyel aktivite sergilediği gözlemlendi. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmalara uygunluk göstermektedir. Bu sonuçlara dayanarak oluşan ufak farklılıklar kullanılan madde konsantrasyonu, mikroorganizma farkı, saf fenolik bileşiğin çözüldürüldüğü çözücü farkından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Zhao ve arkadaşları 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada etanol ile çözdürülen p-Kumarik asitin enfeksiyon etkeni *S.aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8089, *S.typhimurium* ATCC 14028 suşları üzerine in vitro koşullarda antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda p-Kumarik asitin *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı (MİK; 0,625 mg/ml), *E. coli* ATCC 8089 suşuna karşı (MİK: 2,5 mg/ml), *S.typhimurium* ATCC 14028 suşuna karşı (MİK; 2,5 mg/ml) antibakteriyel aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada kullanılan etanol ile çözdürülen p-Kumarik asitin *S.aureus* ATCC 43300 suşuna karşı (MİK; 0,78 mg/ml), *E. coli* ATCC 25922 suşuna karşı (MİK: 1,56 mg/ml), *S.typhimurium* ATCC 14028 suşuna karşı (MİK; 3,12 mg/ml) antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlemlendi. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmalara uygunluk göstermektedir. Bu sonuçlara dayanarak oluşan ufak farklılıklar kullanılan madde konsantrasyonu, mikroorganizma farkı, difüze olan madde miktarının değişikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yaptığımız literatür taramasında probiyotik mikroorganizmalar üzerine, çalışmamızda yer alan bitki ekstraktları ve saf fenolik bileşiklerin disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi ile tespit edilen zon çapı ve MİK değerine rastlanılmamıştır. Çalışmamız diğer çalışmalara rehber olacak nitelikte olduğunu düşünmekteyiz. Saptanmış olan zon çapları ve elde edilen MİK sonuçları ile biyofilm gelişimi gözlenen probiyotik mikroorganizmalar üzerine denenerek özellikle probiyotik mikroorganizmaların sub-

MIK konsantrasyonları kullanılmış ve biyofilm gelişimini arttıran veya inhibe eden oranlar belirlenerek probiyotik preparatların ileri teknolojilerde geliştirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Genel olarak antibakteriyel sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde çalışmamızda yer alan bitki ekstraktları ve saf fenolik bileşiklerin sonuçları arasında antibakteriyel etki açısından literatür çalışmaları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Yapılan çalışmalar özellikle biyofilm oluşturan patojen mikroorganizmaların enfeksiyonlara neden olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle biyofilm oluşturan patojen mikroorganizmaların belirlenerek mortalite oranını azaltmak amacıyla yeni antimikrobiyallerin araştırılması gerekmektedir. Bu bağlamda yüksek seviyede biyofilm oluşturan patojen mikroorganizmaların, hangi türlerine ait olduklarının tespit edilmesi, enfeksiyonlarla mücadelede uygulanacak tedavi yöntemlerinin belirlenmesine katkı sağlamayacağı kanısındayız.

Di Domenico ve arkadaşları 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada kronik enfeksiyonlara neden olan *S. aureus* suşlarını in vitro koşullar altında biyofilm ring yöntemi ile biyofilm üretme kapasitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda atopik dermatit hastalarından izole edilen *S. aureus* suşlarının % 43,0' ü yüksek biyofilm üreticisi, % 41,0' i orta ve % 16,0' sı zayıf biyofilm üreticisi olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikrolaka yöntemi ile enfeksiyon etkeni standart patojen mikroorganizmalardan *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 suşunun yüksek biyofilm üreticisi olduğu, klinik mikroorganizmalardan Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) orta biyofilm üreticisi olduğu yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmalara uygunluk göstermektedir. Özellikle biyofilm üretme yeteneğindeki farklılıklar ekzopolisakkarit üretim miktarına, kullanılan yöntemin elde edilen sonuçları etkilemesine, mikroorganizma tür farkına, fimbriya, pili, majör ve minör matriks bileşenlerin varlığına, çevre etmenlerine bağlı olduğunun kanısındayız. Ayrıca enfeksiyonlarda hastalığın şiddeti ile biyofilm üretiminin ilişkili olduğu ve suşların antibiyotiklere toleransının farklı olmasından

ötürü biyofilm üretiminin kantitatif seviyelerini doğrudan etkilediğini düşündürmektedir.

Biyofilm bileşenlerini kodlayan genlerin varlığını değerlendirmeyi amaçlayan moleküler analizler gerekmektedir. Farklı türlerin ve hatta farklı suşların biyofilm üretme kapasitesinin aynı olmadığı unutulmamalıdır.

Risal ve arkadaşları 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada bağırsak veya idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* suşlarını in vitro koşullar altında mikrolaka yöntemi ile biyofilm üretme kapasitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *E. coli* suşlarının % 3'ü yüksek biyofilm üreticisi, % 29'u orta ve % 18'i zayıf biyofilm üreticisi olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikrolaka yöntemi ile enfeksiyon etkeni standart patojen mikroorganizmalardan *E. coli* ATCC 25922 suşunun orta biyofilm üreticisi olduğu, klinik patojen mikroorganizmalardan *Escherichia coli* suşunun zayıf biyofilm üreticisi olduğu yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmaları destekler niteliktedir. Özellikle biyofilm üretme yeteneğindeki farklılıklar ekzopolisakkarit üretim miktarına, mikroorganizma tür farkına, virülans faktörlerine, flagella (*E.coli* ve *Salmonella* gibi gram negatif bakterilerde bakterilerin yüzey boyunca yayılmasına izin vermektedir), curli olarak bilinen yüzey adezinleri, fimbriya, pili, majör ve minör matriks bileşenlerin varlığına, çevre etmenlerine bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca enfeksiyonlarda hastalığın şiddeti ile biyofilm üretiminin ilişkili olduğu ve suşların antibiyotiklere toleransının farklı olmasından ötürü biyofilm üretiminin kantitatif seviyelerini doğrudan etkilediğini düşündürmektedir.

Heydari ve arkadaşları 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada kronik enfeksiyonlara neden olan *P. aeruginosa* suşlarını in vitro koşullarda mikrolaka yöntemi ile biyofilm üretme kapasitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *P. aeruginosa* suşlarının % 66,7'si yüksek biyofilm üreticisi ve % 33,3'ü zayıf biyofilm üreticisi olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikrolaka yöntemi ile enfeksiyon etkeni standart patojen mikroorganizmalardan *P. aeruginosa* ATCC 27853

suşunun güçlü biyofilm üreticisi olduğu, klinik patojen mikroorganizmalardan *P. aeruginosa* suşunda aynı şekilde güçlü biyofilm üreticisi olduğu yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmalara uygunluk göstermektedir. Özellikle biyofilm üretme yeteneğindeki farklılıklar ekzopolisakkarit üretim miktarına, kullanılan yöntemin elde edilen sonuçları etkilemesine, mikroorganizma tür farkına, virülens faktörlerine, PslA gen varlığına, QS genlerinin ekspresyonunu düzenleme mekanizmalarının varlığına, flagella, fimbriya, pili, majör ve minör matriks bileşenlerin varlığına, çevre etmenlerine bağlı olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca enfeksiyonlarda hastalığın şiddeti ile biyofilm üretiminin ilişkili olduğu ve suşların antibiyotiklere toleransının farklı olmasından ötürü biyofilm üretiminin kantitatif seviyelerini doğrudan etkilediğini düşündürmektedir.

Heydari ve arkadaşları 2015 yılında biyofilm oluşturma potansiyelinin β -laktamaz (ESBL) üreten suşlarda anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Pradhan ve arkadaşları 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan *K. pneumoniae* suşlarını in vitro koşullar altında mikropilaka yöntemi ve kongo red agar yöntemi ile biyofilm üretme kapasitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda kongo red yönteminde *K. pneumoniae* suşlarının % 34,7'si yüksek biyofilm üreticisi, mikropilaka yöntemi uygulandığında ise bu rakamın % 66,6 oranında bulunduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropilaka yöntemi ile enfeksiyon etkeni standart patojen mikroorganizmalardan *K. pneumoniae* ATCC 4352 suşunun güçlü biyofilm üreticisi olduğu, klinik patojen mikroorganizmalardan *K. pneumoniae* suşunda aynı şekilde güçlü biyofilm üreticisi olduğu yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmaları destekler niteliktedir. Özellikle biyofilm üretme yeteneğindeki farklılıklar ekzopolisakkarit üretim miktarına, kullanılan yöntemin elde edilen sonuçları etkilemesine, mikroorganizma tür farkına, flagella, trc ve sugE genlerin varlığına, tip 1 ve tip 3 fimbriya, *E. coli* ortak pilus (ECP), majör ve minör matriks bileşenlerin varlığına ve çevre etmenlerine bağlı olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca

enfeksiyonlarda hastalığın şiddeti ile biyofilm üretiminin ilişkili olduğu ve suşların antibiyotiklere toleransının farklı olmasından ötürü biyofilm üretiminin kantitatif seviyelerini doğrudan etkilediğini düşündürmektedir.

Visvalingam ve arkadaşları 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olan *Salmonella typhimurium* suşlarını in vitro koşullar altında biyofilm üretme kapasitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *Salmonella typhimurium* suşlarının % 80'i orta biyofilm üreticisi olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikrolaka yöntemi ile enfeksiyon etkeni standart patojen mikroorganizmalardan *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşunun orta biyofilm üreticisi olduğu, klinik patojen mikroorganizmalardan *Salmonella typhimurium* suşunda aynı şekilde orta biyofilm üreticisi olduğu yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir.

Probiyotiklerin biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Gómez ve ark.,2016). Biyofilm patojeniteyle ilişkilendirilse de probiyotik mikroorganizmalar için yarar sağlamakta olup biyofilm bu mikroorganizmaları olumsuz çevre koşullarına karşı koruyucu bir etki göstermektedir. Ayrıca biyofilm üreten probiyotik mikroorganizmalar patojen mikroorganizmalarla yarışabilmekte ve özellikle laktik asit bakterilerinin ürettiği biyofilm ile kendilerine kalkan oluşturarak korunmaktadır. Probiyotik mikroorganizmaların biyofilm sayesinde yüzeylere kolaylıkla tutunarak sindirim sisteminde hızlıca kolonize olabildikleri bildirilmiştir (Furukawa 2015; Gómez ve ark. 2016; Cruciata ve ark. 2018; Camilletti ve ark.,2018).

Das ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada dört farklı *Lactobacillus* suşlarını in vitro koşullarda (*Lactobacillus acidophilus* NCFM (ATCC 700396), *L. plantarum* WCFS1 (ATCC BAA-793), *L. brevis* ATCC 367, *L. fermentum* BR 11) bağırsak epitel hücrelerine yapışma yeteneklerini ve biyofilm üretme kapasitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *L. acidophilus*'un mukozaya yapışma kapasitesinin en yüksek ve maksimum ölçekte biyofilm üreticisi olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikrolaka yöntemi ile standart probiyotik mikroorganizmalardan *L. acidophilus* ATCC 4356 suşunun çalışmamızda yer alan

diğer probiyotik mikroorganizmalara kıyasla en yüksek biyofilm üreticisi olduğu, yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmaları destekler niteliktedir. *L. acidophilus* tarafından kompleks biyofilmlerin oluşumu, mukozaya en yüksek bağlanma afinitesine sahip olması ve büyük olasılıkla konakçıda kalıcılığın uzun olduğunu düşündürmektedir.

Chervinets ve arkadaşları 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada ağız boşluğundan izole edilen *L. rhamnosus* (LGG_02380 ve LGG_02400) suşlarını bağırsak epitel hücrelerine yapışma yeteneklerini ve biyofilm üretme kapasitelerini araştırmışlardır. Araştırmacılar *L. rhamnosus* (LGG_02380 ve LGG_02400)' suşlarının mukozaya yapışma kapasitesinin ve biyofilm üretiminin yüksek ve orta düzeyde olduğunu saptamışlardır. Ayrıca biyofilmlerdeki laktobasillerin, patojenik mikrofloranın büyümesini ve çoğalmasını engelleyen bir dizi antibiyotik benzeri maddeyi kolayca sentezleyebildiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropilaka yöntemi ile probiyotik ürün ve preparatlardan izole edilen probiyotik mikroorganizmalardan *L.rhamnosus* suşunun orta düzeyde biyofilm üreticisi olduğu, yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmalara uygunluk göstermektedir. Farklı bakteri türlerinin büyüme ve biyofilm fenotiplerinde gözlenen tutarsızlık, farklı bakteri türlerinde bulunan genomik düzen ve metabolik yollarla ilişkili olarak var olan genlerin rolünü incelemesinin gerekli olduğunu ortaya koymaktadır..

Aoudia ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada insan dışkılarından ve insan tükürüğünden izole edilen *L. plantarum* WCSF1 ve *L. fermentum* ATCC 9338 suşlarını in vitro koşullar altında biyofilm üretme kapasitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *L. plantarum* WCSF1 ve *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 biyofilm üreticisi olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropilaka yöntemi ile probiyotik ürün ve preparatlardan izole edilen probiyotik mikroorganizmalardan *L. plantarum* ve standart probiyotik mikroorganizmalardan *L.fermentum* ATCC 14931 suşunun biyofilm üreticisi olduğu, yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. . Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar

yapılan diğer deneysel çalışmalara uygunluk göstermektedir.. Ayrıca literatürde *L. plantarum* suşa, inkübasyon süresine ve sıcaklığa bağlı olarak, düşük ve yüksek yoğunluklu biyofilmler oluşturabildiği bildirilmiştir.

Han ve arkadaşları 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada kefirde izole edilen *L. kefir* suşunun in vitro koşullar altında biyofilm üretme kapasitesi araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *L. kefir*'nin güçlü biyofilm üreticisi olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikrolaka yöntemi ile probiyotik ürün ve preparatlardan izole edilen probiyotik mikroorganizmalardan *Lactobacillus kefir* suşunun güçlü biyofilm üreticisi olduğu, yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. . Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmalara uygunluk göstermektedir. Yukarıdaki analize göre, spesifik mikrobiyal suşların hücre yüzeyi karakteristikleri ve mikrobiyal agregasyonları nedeniyle birbirlerine yapıştığını ve böylece bir biyofilm oluşturduğunu ve daha sonra, daha fazla mikroorganizma biyofilmlere yapışarak ve birikerek, biyofilm kalınlığını arttırarak güçlü düzeyde biyofilm üretimi gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

Ambalam ve arkadaşları 2014 yılında yapmış oldukları çalışmada *B. bifidum* CCUGb 18364, *B. longum* CCUG 28903 olmak üzere *Bifidobacterium* cinsine ait 24 suş in vitro koşullar altında biyofilm üretme kapasitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *Bifidobacterium* cinsine ait 24 suş güçlü biyofilm üreticisi olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikrolaka yöntemi ile probiyotik ürün ve preparatlardan izole edilen probiyotik mikroorganizmalardan *Bifidobacterium spp* suşu güçlü biyofilm üreticisi olduğu, aynı zamanda standart probiyotik mikroorganizmalardan *B. bifidum* ATCC 2952'nin güçlü biyofilm üreticisi olduğu, çalışmamızda yer alan bir diğer *bifidobacterium* cinsi olan standart probiyotik mikroorganizmalardan *B. longum* ATCC 15707'nin orta düzeyde biyofilm üreticisi olduğu yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmaları destekler niteliktedir.

Couvigny ve arkadaşları 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada Brinza peynirinden izole edilmiş *S. thermophilus JIM8232* suşunun in vitro koşullar altında biyofilm

retme kapasitelerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *S.thermophilus JIM8232* suşu güçlü düzeyde biyofilm üreticisi olduğu bildirilmiştir. Bizim alışmamızda 96 kuyucuklu mikrolaka yöntemi ile standart probiyotik mikroorganizmalardan *S. thermophilus* ATCC 19258 suşu güçlü biyofilm üreticisi olduğu yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmalara uygunluk göstermektedir

Bu çalışmada ayrıca, bitki ekstrelerinin ve saf fenolik bileşiklerin in vitro koşullar altında patojen ve probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimi üzerine aktiviteleri araştırılmıştır. Seçilen bitki ekstrelerinin ve saf fenolik bileşiklerin biyofilm üzerine olumlu/olumsuz aktiviteleri belirlenmiştir.

Literatür taraması yapıldığında; çalışmamızda yer alan bitki ekstrelerinden *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*'nin patojen mikroorganizmaların biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu alışma yapılacak olan diğer çalışmalara rehber niteliğindedir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre DMSO ile çözdürülen *TPS*'nin diğer bakterilere kıyasla *S.aureus* ATCC 43300 suşuna karşı en yüksek antibiyofilm aktivite gösterdiği ve biyofilm gelişimini tüm dozlarda belirli oranlarda inhibe ettiği yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Ayrıca alışmamızda yer alan diğer patojen mikroorganizmalara karşıda biyofilm gelişimini yüksek aktivite ile inhibe ettiği yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Bu sonuçlar neticesinde, *Labiatae* familyasındaki özellikle Türkiye' ye özgü olanlar ve keşfedilmemiş diğer bitki türleri hakkında daha fazla biyolojik araştırmayı teşvik edeceğini düşünmekteyiz.

Literatür taraması yapıldığında; çalışmamızda yer alan bitki ekstrelerinden *Satureja cuneifolia*'nin patojen mikroorganizmaların biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu alışma yapılacak olan diğer çalışmalara rehber niteliğindedir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre DMSO ile çözdürülen *Satureja cuneifolia*'nin diğer bakterilere kıyasla *E.coli* ATCC 25922

suşuna karşı en yüksek antibiyofilm aktivite gösterdiği biyofilm gelişimini belirli oranlarda, tüm dozlarda inhibe ettiği yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda yer alan diğer patojen mikroorganizmalara karşıda biyofilm gelişimini yüksek aktivite ile inhibe ettiği yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. *Satureja cuneifolia*'nın esansiyel yağı kullanılarak yapılan bir çalışmada timolün hidrofobikliği sayesinde hücre zarının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü değiştirdiği ve bu bileşiğin mantarların ve bakterilerin yapışkanlığını ve biyofilm oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Sharifi-Rad ve ark.,2015).

Corral-Lugo ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada saf fenolik bileşiklerden rosmarinik asitin patojen mikroorganizmalardan *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini in vitro koşullar altında araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *P. aeruginosa* PAO1 suşunun güçlü biyofilm üreticisi olduğu ve rosmarinik asitin biyofilm gelişimini engellediği bildirilmiştir. Ayrıca bu bileşiğin özellikle QS aracılı fenotipleri bloke ederek ve rosmarinik asitte yer alan karboksil grubunun yapısal ve fonksiyonel modifikasyonları ile mukoid bir ekzopolisakkarit olan aljinat tabakasında bulunan hücreleri öldürerek *P.aeruginosa* suşunun biyofilm gelişiminin erken evresinde inhibe ettiğini saptamışlardır. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropilaka yöntemi ile standart patojen mikroorganizmalardan *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun güçlü biyofilm üreticisi olduğu, aynı zamanda yüksek antibiyofilm aktivitesi gösterdiği biyofilm gelişimini belirli oranlarda, tüm dozlarda belirli oranlarla inhibe ettiğini yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar yapılan diğer deneysel çalışmalara uygunluk göstermektedir

Slobodníková ve arkadaşları 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada saf fenolik bileşiklerden rosmarinik asitin patojen mikroorganizmalardan *S.aureus* ATCC 43300 suşunun biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini in vitro koşullar altında araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *S.aureus* ATCC 43300 suşunun MİK değeri; 0.6 mg/ml olarak tespit edilmiş ve alt inhibitör konsantrasyonlarda rosmarinik asitin biyofilm gelişiminin erken aşamalarında uygulandığında biyofilm üretimini

baskıladığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikrolaka yöntemi ile standart patojen mikroorganizmalardan *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 suşunun güçlü biyofilm üreticisi olduğu, aynı zamanda yüksek antibiyofilm aktivite gösterdiği biyofilm gelişimini tüm dozlarda belirli oranlarla inhibe ettiğini yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Slobodníková ve arkadaşları rosmarinik asitin mikroorganizmaları inhibe ederken belirli yollar izlediği, bunların birincisi olarak mikrobiyal bağlanma mekanizmalarına müdahale etme, otoindüktör moleküllerine veya reseptörlerini bloke etme (çekirdek söndürme aktivitesi) veya biyofilm matris sentezinin genetik belirleyicilerinin spesifik baskılanması ile aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Elde edilen verilere göre RA, planktonik bakteri formları üzerinde öldürme aktivitesi, biyofilm gelişiminin erken aşamalarında etkili olduğu ve potansiyel bir antimikrobiyal ajan adayı olabileceğini düşünmekteyiz.

Kökümer ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada saf fenolik bileşiklerden malik asitin (0,1g/1ml) çiğ sütlerden izole edilen 20 adet, vankomisine dirençli, *S. aureus* suşlarının biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini in vitro koşullar altında araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda %10'luk konsantrasyondaki malik asitin *S. aureus* suşlarına karşı en fazla % 47 oranında önlediği, oluşan biyofilmin de en fazla %85 oranında ortadan kaldırıldığını bildirmişlerdir. Malik asitin hücre zarından geçerek hücre sitoplazmasına ulaştığını, ortamı aside dönüştürerek, hücrenin sitoplazmasının iç pH değerini dengelemek amacıyla protonları (pH) hücre dışına pompaladığını, bu sırada enerji kaybederek hücre zarına zarar verdiğini ve DNA'yı denatüre ettiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikrolaka yöntemi ile standart patojen mikroorganizmalardan *S. aureus* ATCC 43300 suşunun güçlü biyofilm üreticisi olduğu, aynı zamanda yüksek antibiyofilm aktivite gösterdiği biyofilm gelişimini tüm dozlarda belirli oranlarla inhibe ettiğini yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Organik asitlerin antibiyofilm etkisi bir asitten diğerine değişmekte, konsantrasyona, pH'a veya organik asitlerin kimyasal yapısına bağlı olarak değişmektedir, ayrıca bakterilerin antibiyofilm aktivite gösterirken direnç göstermesinin nedeni olarakta yüksek yoğunluklu matris içeriğinden kaynaklanan ek difüzyon sınırlamaları getirerek engel olduklarını düşünmekteyiz.

Hancock ve arkadaşları 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada saf fenolik bileşiklerden tannik asitin idrar yolu enfeksiyonuna neden olan patojen mikroorganizmalardan *E. coli* UTI suşunun biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini in vitro koşullar altında araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *E. coli* UTI suşunun MİK değeri; 0,6 mg/ml olarak tespit edilmiş ve alt inhibitör konsantrasyonlarda tannik asitin biyofilm gelişimini inhibe etmediği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropilaka yöntemi ile klinik patojen mikroorganizmalardan *E. coli* suşunun MİK değeri; 0,65 mg/ml olarak tespit edilmiş, biyofilm gelişimini belirli oranlarda inhibe ettiği yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. *E. coli* suşunun uyguladığımız konsantrasyonların hepsinde inhibe edilmemesinin nedeni olarak; yaptığımız literatür taramalarında *E. coli* tarafından hücre zarının bütünlüğünü korumayı amaçlayan ve tanenlere gösterilen direnç ile ilişkili olarak transkripsiyonel tepkilere sebebiyet verdiği bildirilmiştir.

Dong ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada saf fenolik bileşiklerden tannik asitin idrar yolu enfeksiyonuna neden olan patojen mikroorganizmalardan *S. aureus* ATCC 25923 suşunun biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini in vitro koşullar altında araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda *S. aureus* ATCC 25923 suşunun tannik asitin biyofilm gelişimini %76 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropilaka yöntemi ile standart patojen mikroorganizmalardan *S. aureus* ATCC 43300 suşunun yüksek antibiyofilm aktivite gösterdiği ve biyofilm gelişimini belirli oranlarda inhibe ettiği yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir.

Payne ve ark., (2013) Litik transglikozilazlar, N-asetilmuramik asit (MurNAc) ve N-asetilglukozamin (GlcNAc) arasındaki β -1,4-glikosidik bağın parçalanmasını katalizleyen benzersiz bir lizozim enzim sınıfıdır. Peptidoglikan tabakasının polisakkarit omurgasını ayırma kabiliyetleri sayesinde, litik transglikozillerin peptidoglikanın sentezinde ve degradasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir. Litik transglikozillerin hücresel uzama, ayrılma, muropeptitlerin geri dönüşümü ve gözenek oluşumunda önemli rol oynadığını öne sürmüşlerdir. Peptidoglikan tabakasının

parçalanması biyofilm oluşumunda bir azalmaya yol açmaktadır. Örneğin peptidoglikan bölünmesi, hücre duvarında görüntülenen proteinlerin ve teikoik asitlerin bileşimini değiştirebilir ve yüzey kolonizasyonu için gerekli faktörleri silebildiğini bildirmişlerdir. IsaA (immünodominant stafilokok antijen A) varsayılan bir litik transglikozilazdır. Tannik asidin hücre dışı IsaA seviyelerinde bir artışa neden olduğu ve artan IsaA seviyelerinin *S. aureus*'ta biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini ve ekzopolisakkarit üretimini azalttığını bildirmişlerdir. Şu anda hücre dışı IsaA seviyelerinin yükselmesine yol açan moleküler mekanizma bilinmemektedir.

Lou ve arkadaşları 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada saf fenolik bileşiklerden p-Kumarik asitin patojen mikroorganizmalardan *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşunun biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini in vitro koşullar altında araştırmışlardır. Araştırmacılar *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşunun MİK değeri; 0,25 mg/ml olarak tespit edilmiş ve bu konsantrasyonun *P. aeruginosa* ATCC 9027'nin biyofilm gelişimini %100 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropilaka yöntemi ile standart patojen mikroorganizmalardan *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun MİK değeri; 0,78 mg/ml olarak tespit edilmiş, antibiyofilm aktivite gösterdiği 2MİK (inhibisyon oranı; %85), MİK (inhibisyon oranı; %97), MİK/2 (inhibisyon oranı; %95), MİK/4 (inhibisyon oranı; %96) , MİK/8 (inhibisyon oranı; %95) , MİK/16 (inhibisyon oranı; %94) , MİK/32 (inhibisyon oranı; %92), MİK/64 (inhibisyon oranı; %65) MİK/128 (inhibisyon oranı; %45), MİK/256 (inhibisyon oranı; %46), MİK/512 (inhibisyon oranı; %13), MİK/1024 (inhibisyon oranı; %7) konsantrasyonlar biyofilm gelişimini belirli oranlarda inhibe ettiğini yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak oluşan ufak farklılıklar kullanılan madde konsantrasyonu, kullanılan yöntemin elde edilen sonuçları etkilemesi, mikroorganizma farkından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

İnsan bağırsağında ve derisinde probiyotik mikroorganizmaların etkinliğini gösterebilmesi için eşik seviyesinin üzerinde bir popülasyon yoğunluğuna ihtiyacı vardır. Bu nedenle doğal olarak tüketmiş olduğumuz bitki ekstraktların ve saf fenolik bileşiklerin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimini destekleyerek

gastrointestinal sistemde stres koşullarına karşı dayanıklı ve daha uzun süre kalıcılığın artırılması hedeflenmiştir. Sonuç olarak deneysel aşamamızda öldürücü doz (MİK) kullanılmamış olup alt dozlarının biyofilm gelişimi üzerinde etkinliği araştırıldı ve biyofilm üretiminin artırılması, bazı doğal bileşiklerin mikropların büyümesini destekleyebileceğine dair raporları doğrular niteliğindedir.

Literatür taraması yapıldığında; çalışmamızda yer alan bitki ekstraktlarından *Thymus praecox subsp. skorpilii* var. *skorpilii*'nin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre DMSO ile çözöürölen TPS'nin *E.faecium* suşuna karşı MİK/8 konsantrasyonunda biyofilmi %151 (1 kat arttırdığı) oranında arttırdığı, *L.acidophilus* ATCC 4356 suşuna karşı MİK/16 konsantrasyonunda biyofilmi %33 oranında arttırdığı, *L.plantarum* suşuna karşı MİK/32 konsantrasyonunda biyofilmi (1 kat arttırdığı) oranında arttırdığı, *S. thermophilus* ATCC 19258 suşuna karşı MİK/4 konsantrasyonunda biyofilmi %100 (1 kat arttırdığı) oranında arttırdığı, *B. longum* ATCC 15707 suşuna karşı MİK/2 konsantrasyonunda biyofilmi %172 (1 buçuk kat arttırdığı) oranında arttırdığı, *B. bifidum* ATCC 29521 suşuna karşı MİK/64 konsantrasyonunda biyofilmi %39 oranında arttırdığı, yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Yukarıdaki analize göre, bitkilerin mikroorganizmalar üzerine farklı etkinlikleri; spesifik mikrobiyal suşların hücre yüzeyi karakteristikleri, kullanılan madde konsantrasyonu, bitkinin sıvıda difüze olma oranı ve mikrobiyal agregasyonlarına bağılı olduğunu düşünmekteyiz. Bu sonuçlar neticesinde, Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar yapılan diğör deneysel çalışmalara uygunluk göstermektedir Bu sonuçlar neticesinde, *Thymus praecox subsp. skorpilii* var. *skorpilii*'nin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimini arttırarak işlevsel gıdaların üretimini, verimini ve kalitesi için bir araç olabileceklerini, probiyotik preparatların geliştirilerek daha etkin hale getirilmesi ve böylece insan sağığına ikili bir şekilde faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Yaptığımız literatür taramasında; çalışmamızda yer alan bitki ekstraktlarından *Satureja cuneifolia*'nin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre DMSO ile çözöürölen *Satureja cuneifolia*'nin *L.fermentum* ATCC 14931 suşuna karşı MİK/64 konsantrasyonunda biyofilmi %23,56 oranında arttırdığı, *E.faecium* suşuna karşı MİK/8 konsantrasyonunda biyofilmi %168 (1 buçuk kat arttırdığı) oranında arttırdığı, *L. acidophilus* ATCC 4356 suşuna karşı MİK/16 konsantrasyonunda biyofilmi %32 oranında arttırdığı, *L.plantarum* suşuna karşı MİK/32 konsantrasyonunda biyofilmi %80 oranında arttırdığı, *S. thermophilus* ATCC 19258 suşuna karşı MİK/8 konsantrasyonunda biyofilmi %26 oranında arttırdığı, *B. bifidum* ATCC 29521 suşuna karşı MİK/64 konsantrasyonunda biyofilmi %44 oranında arttırdığı, yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Bu sonuçlar neticesinde, *Satureja cuneifolia*'nin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimini arttırarak işlevsel gıdaların üretimini, verimini ve kalitesi için bir araç olabileceklerini, probiyotik preparatların geliştirilerek daha etkin hale getirilmesi ve böylece insan sağlığına ikili bir şekilde faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Literatürde çalışmamızda yer alan saf fenolik bileşiklerden rosmarinik asitin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre DMSO ile çözöürölen rosmarinik asitin *E.faecium* suşuna karşı MİK/8 konsantrasyonunda biyofilmi %95 (1 kat arttırdığı) oranında arttırdığı, *L. acidophilus* ATCC 4356 suşuna karşı MİK/16 konsantrasyonunda biyofilmi %31 oranında arttırdığı, *L.plantarum* suşuna karşı MİK/32 konsantrasyonunda biyofilmi %140 (1 buçuk kat arttırdığı) oranında arttırdığı, *S. thermophilus* ATCC 19258 suşuna karşı MİK/16 konsantrasyonunda biyofilmi %64 oranında arttırdığı, *B. bifidum* ATCC 29521 suşuna karşı MİK/256 konsantrasyonunda biyofilmi %42 oranında arttırdığı, yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Bu sonuçlar neticesinde, rosmarinik asitin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimini arttırarak işlevsel gıdaların üretimini, verimini ve kalitesi için bir araç olabileceklerini, probiyotik preparatların geliştirilerek daha etkin hale getirilmesi ve böylece insan sağlığına ikili bir şekilde faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Literatür taraması yapıldığında; çalışmamızda yer alan saf fenolik bileşiklerden tannik asitin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre etanol ile çözdürülen tannik asitin diğer bitki ekstraları ve saf fenolik bileşiklere kıyasla en yüksek aktiviteye sahip olduğu, tüm probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimini arttırdığı, yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Reverón ve arkadaşları 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) tarafından gözlenen *L. plantarum* suşunun tannik asiti hidroliz (tannaz) etmeyi sağlayan TanLp1 (lp_2956) geni tarafından kodlanan tanen asilhidrolaz enzimine sahip olduğunu ve bu enzimin özellikle gastrointestinal sistemde hayatta kalmasını artırabilecek moleküler bir özelliği işaret ettiğini ve hücre büyümesini desteklediğini bildirmişlerdir. Ek olarak, tannik asit içeren bir ortama gönderilen *L. plantarum*'un tannik asite uyarlanmış hücrelerinin, durağan faz sırasında uzun bir canlılık sergilediği saptanmıştır. Bu sonuç tannik asit stresi üzerine bu mikroorganizma için daha önce gözlenen hücre duvarı biyogenezinde yer alan bazı anahtar proteinlerin artan sentezine bağlanmıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise kırmızı şarapta yer alan tannik asit verilen sıçanlarda mikroorganizmaların toplam bakteri sayıları ve kontrol parametreleri karşılaştırılmış, kolon içeriğinde Propionibakteri, Bacteroides ve Clostridia'nın azaldığı, Lactobacilli ve Bifidobacteria sınıfına ait yararlı bakterilerin arttığı bildirilerek, liflerin ve prebiyotiklerin etkisine benzer bir etki gösterdiği ve bağırsak fonksiyonu için yararlı olduğu bildirilmiştir (Dolara ve ark.,2005). Tannik asitin bağırsak mikrobiyotasını nasıl etkilediğine ilişkin bilgilerden faydalanmak için, bu polifenollerin bağırsak mikroorganizmaları üzerindeki etkileri ve kullanılan mekanizmalar hakkında daha derin bir bilgi gereklidir. Bu bilgi, bağırsak ekosistemimizin ve konakçı sağlığımızın daha iyi yönetilmesine katkıda bulunmakta olup, tannik asitin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimini arttırarak işlevsel gıdaların üretimini, verimini ve kalitesi için bir araç olabileceklerini, probiyotik preparatların geliştirilerek daha etkin hale getirilmesi ve böylece insan sağlığına ikili bir şekilde faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Yapıdan literatür taramasında; çalışmamızda yer alan saf fenolik bileşiklerden malik asitin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre etanol ile çözdürülen malik asitin *L.fermentum* ATCC 14931 suşuna karşı MİK/8 ile MİK/16 konsantrasyonlarında sırasıyla biyofilmi % 202 (2 kat arttırdığı) ve % 238 (2 buçuk kat arttırdığı) oranında arttırdığı, *E.faecium* suşuna karşı MİK/8 konsantrasyonunda biyofilmi % 108 (1 kat arttırdığı) oranında arttırdığı, *L.plantarum* suşuna karşı MİK/4, MİK/8, MİK/16, MİK/32 konsantrasyonlarında sırasıyla biyofilmi %129 (1 kat arttırdığı), %137 (1 kat arttırdığı), % 145 (1 kat arttırdığı), % 166 (1 kat arttırdığı) oranında arttırdığı, *S. thermophilus* ATCC 19258 suşuna karşı MİK/8, MİK/16, MİK/32 konsantrasyonlarında sırasıyla biyofilmi %99 (1 kat arttırdığı), %74, %83 oranında arttırdığı, *B. bifidum* ATCC 29521 suşuna karşı MİK/32 konsantrasyonunda biyofilmi %44 oranında arttırdığı, yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Yukarıdaki analize göre, bitkilerin mikroorganizmalar üzerine farklı etkinlikleri; spesifik mikrobiyal suşların hücre yüzeyi karakteristikleri, kullanılan madde konsantrasyonu, bitkinin sıvıda difüze olma oranı, maddenin hidrofobikliği ve mikrobiyal agregasyonlarına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Bu sonuçlar neticesinde, malik asitin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimini arttırarak işlevsel gıdaların üretimini, verimini ve kalitesi için bir araç olabileceklerini, probiyotik preparatların geliştirilerek daha etkin hale getirilmesi ve böylece insan sağlığına ikili bir şekilde faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Literatür taraması yapıldığında; çalışmamızda yer alan saf fenolik bileşiklerden p-Kumarik asitin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimi üzerine, aktivite etkinliklerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre etanol ile çözdürülen p-Kumarik asitin *L.plantarum* suşuna karşı MİK/32 konsantrasyonunda biyofilmi % 67 oranında arttırdığı, *S. thermophilus* ATCC 19258 suşuna karşı MİK/16 konsantrasyonunda biyofilmi % 72 oranında arttırdığı, yapmış olduğumuz deneysel çalışma neticesinde belirlenmiştir. Bu sonuçlar neticesinde, p-Kumarik asitin probiyotik mikroorganizmaların biyofilm gelişimini arttırarak işlevsel gıdaların üretimini, verimini ve kalitesi için bir araç olabileceklerini,

probiyotik preparatların geliştirilerek daha etkin hale getirilmesi ve böylece insan sağlığına ikili bir şekilde faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Yaptığımız literatür araştırmalarında çalışmamızda yer alan bitki ekstralarının ve saf fenolik bileşiklerin tıbbi yararının aydınlatılması noktasında sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızın, kullanmış olduğumuz bitki ekstraları ve saf fenolik bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi, patojen ve probiyotik mikroorganizmalarımızın biyofilm oluşturma kapasitesi ve bu bitkisel ajanların biyofilm gelişimi üzerine etkisi araştırılmış olup tıp ve endüstriyel alan olmak üzere birçok alana faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Araştırmamızda yer alan bitkisel ajanların patojen mikroorganizmalara karşı belirli oranlarda antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan bu bitkisel ajanların yüksek antimikrobiyal aktivite göstermeleri nedeniyle enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için doğal tamamlayıcılar olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak test edilen bitkisel ajanların klinikte güvenli bir şekilde kullanılabilmesi için sitotoksikite çalışmalara ve in vivo koşullarda çalışmalara ihtiyaç olduğu görüşündeyiz. Yapmış olduğumuz deneysel çalışmada, bu çeşit araştırmaların sonuçlarının pratikte uygulanabilirliğine dair bazı temel bilgilerin belirlenmesine katkı sağlamaktadır.

Araştırmamızda yer alan patojen ve probiyotik mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasitesi belirlenmiş olup tüm suşlarımızın zayıf, orta ve güçlü düzeyde biyofilm üreticisi olduğu saptanmıştır. Endüstriyel ortamlar ve uygulamalar için risk oluşturabilecek veya fayda sağlayabilecek suşların belirlenmesi çok önemlidir. Patojen mikroorganizmalarda biyofilm oluşumu antimikrobiyal tedavilerin etkinliğini ve sonraki enfeksiyonların sonuçlarını etkiler. Bu nedenle, biyofilm üreticisinin erken belirlenmesi, biyofilm aracılı enfeksiyonların tedavisinde ve yaşamı tehdit eden nozokomiyal enfeksiyonlardan muzdarip hastalarda morbidite ve mortalite oranının azaltılmasına yardımcı olacak, sonuçta yeni ve etkili yaklaşımların tasarlanmasında ve kullanılmasında fayda sağlayacağını düşünmekteyiz. Ayrıca probiyotik mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasitesinin belirlenmesi in vivo koşullarda

yapılacak çalışmalar ile desteklenerek, gelecekteki probiyotik ürün ve preparatların geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak; çalışmamızda kullanılan patojen ve probiyotik mikroorganizmaların farklı biyofilm gruplarına göre dağılım oranları incelendiğinde, bütün suşların biyofilm oluşturduğu belirlendi. Buna ilaveten araştırmamızda incelenen bitkisel ajanların biyofilm gelişimi üzerine etkisi araştırılmış, patojen mikroorganizmalar üzerinde belirli oranlarda antibiyofilm etki gösterdiği saptanmıştır. Bu bitkisel ajanların antibiyofilm özelliğinin incelenmesi ile biyofilmin meydana getirdiği zararlı etkileri durdurabilmekte, mikroorganizmalar tarafından yüzeylerin ve epitelyal mukozanın kolonizasyonunun azaltılması için umut vaat etmekte ve bu doğrultuda endüstriyel ve sağlık alanlarında katkı sağlamaktadır. Ayrıca biyofilm gelişimi in vitro koşullarda arttırılarak işlevsel gıdaların üretimini, verimini ve kalitesi için bir araç olabileceklerini, probiyotik preparatların geliştirilerek daha etkin hale getirilmesi ve böylece insan sağlığı için oldukça yararlı olabileceği kanısındayız.

8. KAYNAKÇA

Abatenh.E.,Gizaw.B.,Tsegay.Z., Tefera,.G., Aynalem.E. Health benefits of probiotics. J Bacteriol Infec Dis. 2018;2(1):8-27.

Abdallah M, Khelissa O, Ibrahim A, Benoliel C, Heliot L, Dhulster P, Chihib NE. Impact of growth temperature and surface type on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. Int J Food Mikrobiol. 2015; Dec 2; 214():38-47.

Abdallah M, Benoliel C, Drider D, Dhulster P, Chihib N.-E. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. 2014;196 453–472.

Abdelazez A, Abdelmotaal H, Zhu Z,Fang-Fang J, Sami R, Zhang L, Al-Tawaha A, Meng I. Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. 2018; 12(1): pages 16-27.

Abdel-Wahab, M.H., El-Mahdy, M.A., Abd-Ellah, M.F., Helal, G.K., Khalifa F., Hamada, F.M.A. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. Pharmacological Research, 2003; 48, 461-465.

Abenavoli L, Milic N, Luzzza F, Boccuto L, De Lorenzo A. Polyphenols treatment in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J Transl Int Med 2017; 5(3): 144.

Abraham BP, Quigley EMM.Probiotics in Inflammatory Bowel Disease.Gastroenterol Clin North Am. 2017;46(4):769-782.

Adamczak A, Ożarowski M, Karpiński TM. Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. J Clin Med. 2019; 31;9(1).

Adlerberth I, Ahrne's S, Johansson ML, Molin G, Hanson LA° . and Wold AE. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. Appl Environ Mikrobiol 1996; 62, 2244–2251.

Ahmad I, Asad Khan M, Syed Hassan M, Zafaryab M, Ahmad P and Moshahid A Rizvi M. Cucurbit Extracts Augment Biofilm Formation by Probiotic Lactobacilli: An In Vitro Study. Irfan et al., J Mikrob Biochem Technol 2017; 9(3):122-125.

Akhtar MS, Hossain MA, Said SA. Isolation and characterization of antimicrobial compound from the stem-bark of the traditionally used medicinal plant *Adenium obesum*. J. Tradit. Complem. Med. 2017; 7, 296–300.

Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 48, Issue 4, October 2001; Pages 487–491.

Al Hafi M, El Beyrouthy M, Ouaini N, Stien D, Rutledge D, Chaillou S. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Satureja*, *Thymus*, and *Thymbra* Species Grown in Lebanon. Chem Biodivers. 2017;14(5).

Albu MG, Cotrut C, Titorencu I, Trandafir V. & Giurginca M. Biomaterials based on collagen and tannic acid, 1st International Leather Engineering Symposium, Izmir, Turkey, 2009; 377–386.

Allı B, “Sumak ekşisinden elde edilen malik asit kalsiyum kompleksinin yapısal karakterizasyonu ve retina hücrelerinde hidrojen peroksit ile oluşturulan hücre hasarında koruyucu rolünün araştırılması” Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ,Yüksek Lisans Tezi,2018, Kahramanmaraş (Danışman: DR. ÖĞR. ÜYESİ GÖKHAN CEYHAN ; DOÇ. DR. AKİF HAKAN KURT).

Alp and Aslim G, Alp B. Aslim. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium spp.* Isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 2010; 101-105.

Altundağ Ş, Karahan A, Aksu P, Kılınç P, İnvitro koşullarda *Satureja cuneifolia Ten.* uçucu yağının bazı buğday patojeni bakteriler üzerine antibakteriyel etkisinin araştırılması *BİTKİ KORUMA BÜLTENİ* 2010; (50): 25-33.

Altuntas Y. Mikrobiota and Metabolic Syndrome. *Turk Kardiyoloji Dernegi Arsivi- Archives of the Turkish Society of Cardiology* (2017).

Amarna C. Probiotics. University of Maryland, CLFS609D. (2013).

Ambalam P, Kondepudi KK, Nilsson I, Wadstrom T, Ljungh A. Bile enhances cell surface hydrophobicity and biofilm formation of bifidobacteria. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014;172(4):1970-81

Amund OD, Ouoba LI, Sutherland JP, Ghoddusi HB. Assessing the effects of exposure to environmental stress on some functional properties of *Bifidobacterium animalis ssp. lactis*. *Benef Mikrobies*. 2014 Dec;5(4):461-9

Anagnostopoulos DA, Bozoudi D, Tsaltas D. Enterococci Isolated from Cypriot Green Table Olives as a New Source of Technological and Probiotic Properties. *Fermentation* 2018; 4, 48.

Anonymous. FDA. 2011. Bacterial Pathogen Growth and Inactivation. Fish and Fishery Products, Hazards and Controls Guidance. Retrieved from <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM252447.pdf>

Aoudia N, Rieu A, Briandet R, Deschamps J, Chluba J, Jegu G, Garrido C, Guzzo J. Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress

responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. Food Mikrobiol. 2016 Feb; 53(Pt A):51-9.

Araújo P, Lemos M, Mergulhão F, Melo L, Simões M. Antimikrobial resistance to disinfectants in biofilms: Science against mikrobial pathogens: communicating current research and technological advances, Ed.: Méndez-Vilas, A., Formatex, Badajoz, Spain, 2011; pp: 826-834.

Araújo TF, Ferreira CL. The Genus Enterococcus As Probiotic: Safety Concerns. Braz. Arch. Biol. Technol. May/June 2013; v.56 n.3: pp. 457-466.

Aydemir DH. Bakteriyal Biyofilmlerin Biyolojik Önemi ve Etkili Kontrol Stratejileri, Turkish Journal of Life Sciences 2018; 3/1:218-230.

Azaz(a).A.D, Demiki F, Satıl F, Kürkçüoğlu M, Başer KHC. Bazı Satureja uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri. 2004;2-8.

Bag A, Chattopadhyay RR. Synergistic antibacterial and antibiofilm efficacy of nisin in combination with p-coumaric acid against food-borne bacteria *Bacillus cereus* and *Salmonella typhimurium*. Lett Appl Mikrobiol. 2017 Nov;65(5):366-372.

Bai N, He K, Roller M, Lai CS, Shao X, Pan MH, Ho CT. Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. J Agric Food Chem, 2010;58(9), 53637.

Bakır E. Probiyotik bakterilerin dondurma üretiminde kullanımı üzerine bir çalışma. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2015, Kahramanmaraş (Danışman: DOÇ. DR. KENAN SİNAN DAYISOYLU)

Bali V, Panesar PS, Bera MB, Kennedy JF. Bacteriocins: recent trends and potential applications. Crit Rev Food Sci Nutr. 2016;56(5):817-34.

Bansal S, Mangal M, Sharma SK, Gupta RK. Non- dairy based probiotics: A healthy treat for intestine. Crit Rev Food Sci Nutr. 2016;56 (11): 1856-1867.

Barancheshme F, Munir M. Development of Antibiotic Resistance in Wastewater Treatment Plants. Reviewed: September 16th 2018: May 2nd 2019.

Baruah R., Das D, Goyal A. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria: current trends and applications. Journal of Probiotics and Health, 2016; 4(2): 1-6.

Başıoğlu MT. Probiyotikler. İzmir Üniv Tıp Derg. 2014; 3:37-40.

Beerens H. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium spp* (1990).

Beğendik F. İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojide Biyofilm. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Flora 2003;8(4):271-277

Bermudez M., and T C Hazen. Phenotypic and genotypic comparison of *Escherichia coli* from pristine tropical waters. Appl Environ Mikrobiol. 1988;54:979–983.

Boerlin P, Kuhnert P, Hüsey D, Schaellibaum M. Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolates in Cases of Bovine Mastitis. J Clin Mikrobiol. 2003 Feb;41(2):767-71.

Bogino PC, Oliva Mde L, Sorroche FG, Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. Int J Mol Sci. 2013 Jul 30;14(8):15838-59.

Boonyarikpunchai W, Sukron S and Towiwat P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. Pharmacol., Biochem. Behav., 2014;124: 67-73.

Bozhüyük AU, Kordali Ş, Bölük G. *Satureja hortensis* L. Uçucu Yağının Antifungal Etkisi. Atatürk Univ., J. of the Agricultural Faculty, , 2015;46 (2): 107-112.

Bravo-Ferrada BM, Hollmann A, Brizuela N, La Hens DV, Tymczyszyn E, Semorile L. Growth and consumption of L-malic acid in wine-like medium by acclimated and non-acclimated cultures of Patagonian *Oenococcus oeni* strains. *Folia Mikrobiol (Praha)*. 2016 Sep;61(5):365-73.

Bujnakova D, Kmet V. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Folia Mikrobiol*. 2012;57:263–267.

Bulgakov VP, Inyushkina YV and Fedoreyev SA. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* (2012); 32: 203–217.

Burkinshaw SM. & Kumar N. The mordant dyeing of wool using tannic acid and feso4, part 1: Initial findings, *Dyes and Pigments*, 2009;80, 53–60.

Cam ME, Hazar-Yavuz AN, Yildiz S, Ertas B, Ayaz Adakul B, Taskin T, Alan S, Kabasakal L J. The methanolic extract of *Thymus praecox subsp. skorpilii* var. *skorpilii* restores glucose homeostasis, ameliorates insulin resistance and improves pancreatic β -cell function on streptozotocin/nicotinamide-induced type 2 diabetic rats. *Ethnopharmacol*. 2019 Mar; 1;231:29-38.

Camargo A C, Woodward JJ, Call DR., Nero LA. *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian Scenario. 2017;14 623–636.

Camilletti AL, Ruíz FO, Pascual LM, Barberis IL. First Steps towards the Pharmaceutical Development of Ovules Containing *Lactobacillus* Strains: Viability and Antimicrobial Activity as Basic First Parameters in Vaginal Formulations. *AAPS PharmSciTech*. 2018 Feb;19(2):886-895.

Carasi P, Díaz M, Racedo SM, De Antoni G, Urdaci MC, Serradell Mde L. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. Biomed Res Int. 2014;2014:208974.

Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences with particular references to hygiene in the food industry. Journal of Applied Bacteriology, 1993;75, pp: 499 511.

Chandra H, Bishnoi P, Yadav A, Patni B, Mishra AP, Nautiyal AR. Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials—A Review. Plants (Basel). 2017 Apr; 10;6(2).

Chapot-Chartier MP, Kulakauskas S. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. 2014 Aug 29;13 Suppl 1:S9.

Chervinets Y, Chervinets V, Shenderov B, Belyaeva E, Troshin A, Lebedev S, Danilenko V. Adaptation and Probiotic Potential of *Lactobacilli*, Isolated from the Oral Cavity and Intestines of Healthy People. Probiotics Antimicrob Proteins. 2018 Mar;10(1):22-33.

Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloy MGJ, Orange N, Dufour A, Cornelis P. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins FEMS Mikrobiol Rev. 2017 Sep 1;41(5):698-722.

Chi Z, Wang ZP, Wang GY, Khan I, Chi ZM. Mikrobial biosynthesis and secretion of l-malic acid and its applications. Crit Rev Biotechnol. 2016;36(1):99-107.

Chmielewsky R.A.N., Frank J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2003;2, pp: 22 32.

Chung KT, Stevens SE. Jr Lin WF, Wei CI. Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. Lett. Appl. Mikrobiol., 1993;1, 29–32

CLSI, 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA

Colagiorgi A, Bruini I, Di Ciccio PA, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry Pathogens. 2017 Sep 4;6(3):41.

Corral-Lugo A, Daddaoua A, Ortega A, Espinosa-Urgel M, Krell T. Rosmarinic acid is a homoserine lactone mimic produced by plants that activates a bacterial quorum-sensing regulator. Sci Signal. 2016 Jan 5;9(409)

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 1999; 284, pp: 1318 1322.

Couvigny B, Th  rial C, Gautier C, Renault P, Briandet R, Gu  don E. Streptococcus thermophilus Biofilm Formation: A Remnant Trait of Ancestral Commensal Life?. PLoS One. 2015 Jun 2;10(6):e0128099.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Mikrobiol. Rev., 1999;12(4):564-82.

Cruciata M., Gaglio R., Scatassa ML, Sala G, Cardamone C, Palmeri M, Moschetti G, La Mantia T, Settanni L. Formation and characterization of early bacterial biofilms on different wood typologies applied in dairy production. Applied and Environmental Mikrobiology, 2018;84(4): 1-13.

Çam ME, Yıldız S, Ertaş B, Acar AE , Taşkın T, Kabasakal L.2017 Antidiabetic effects of *Salvia triloba* and *Thymus praecox subsp. skorpilii* var. *skorpilii* in a rat model of streptozotocin/nicotinamide-induced diabetes Marmara Pharmaceutical Journal 2017;21/4: 818-827.

Çetin M, Göçmen M.Kanatlı Hayvanların Beslenmesinde Antibiyotiklere Alternatif Olarak Kekik (Thyme) Kullanmanın Etkileri J.Agric. Fac. HR.U., 2013, 17(3): 35-40.

D'aımmo, MR., Modesto M., Biavati B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium spp.* isolated from dairy and pharmaceutical products. Int. J. food Mikrobiol, 2007;115: 35-42.

Dağsuyu E.Bazı bitki ekstraları ve kimyasal maddelerin antioksidan aktiviteleri ve histon deasetilazın inhibisyonu. Kimya Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi,2015,(Danışman: PROF. DR. REFİYE YANARDAĞ).

Darvin P, Joung YH, Kang DY, Sp N, Byun HJ, Hwang TS, Sasidharakurup H, Lee CH, Cho KH, Park KD, Lee HK, Yang YM."Tannic acid inhibits EGFR/STAT1/3 and enhances p38/STAT1 signalling axis in breast cancer cells".J Cell Mol Med. 2017 Apr;21(4):720-734.

Das C, Mokashi C, Mande SS, Saini S. Dynamics and Control of Flagella Assembly in *Salmonella typhimurium*. Front Cell Infect Mikrobiol. 2018 Feb 8;8:36.

Das JK, Mahapatra RK, Patro S, Goswami C, Suar M. *Lactobacillus acidophilus* binds to MUC3 component of cultured intestinal epithelial cells with highest affinity. FEMS Mikrobiol Lett. 2016 Apr;363(8).

Daş YK,Atmaca E, Antibiyotik Direncinin Önlenmesi İçin Yapılması Gerekenler ve Çözüm Önerileri.Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics 2015;1(2).

Dauqan EMA, Abdullah A. Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol. 5 (02), pp. 017-022, March-April, 2017.

Değirmenci C. Utilization of whey powder in the encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* by spray drying for the production of probiotic yogurt. Orta Doğu Teknik Üniversitesi. 2017;19-20.

Demirpek.U. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri. (2012).

Devriese L, Baele M, Butaye P. The genus *Enterococcus*: Taxonomy. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K-H. Schleifer and E. Stackebrandt. The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd edn. New York: Springer. vol. 4;2006.163-174.

Di Domenico EG, Cavallo I, Bordignon V, Prignano G, Sperduti I, Gurtner A, Trento E, Toma L, Pimpinelli F, Capitanio B, Ensoli F. Inflammatory cytokines and biofilm production sustain *Staphylococcus aureus* outgrowth and persistence: a pivotal interplay in the pathogenesis of Atopic Dermatitis. Sci Rep. 2018 Jun 28;8(1):9573

Diniz-Silva HT, Cirino IC, Falcão-Silva Vdos S, Magnani M, de Souza EL, Siqueira-Júnior JP. Tannic Acid as a Potential Modulator of Norfloxacin Resistance in *Staphylococcus aureus* Overexpressing *norA* Chemotherapy. 2016;61(6):319-22.

Divyashri G, Krishna G, Muralidhara, Prapulla SG. Probiotic attributes, antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory effects of *Enterococcus faecium* CFR 3003: in vitro and in vivo evidence. J Med Mikrobiol. 2015 Dec; 64(12):1527-40.

Dolara P, Luceri C, De Filippo C, Femia AP, Giovannelli L, et al. Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal Mikroflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. Mutat Res 2005;591: 237–246.

Domitille Fayol-Messaoudi, Cédric N. Berger, Marie-Hélène Coconnier-Polter, Vanessa Liévin-Le Moal, Alain L. Servin. pH-, Lactic Acid-, and Non-Lactic Acid-Dependent Activities of Probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. Appl Environ Mikrobiol. 2005 Oct; 71(10): 6008–6013.

Dong G, Liu H, Yu X, Zhang X, Lu H, Zhou T, Cao J. Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus*. Nat Prod Res. 2018 Sep;32(18):2225-2228.

Donlan RM. Biofilms: Mikrobial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002 Sep;8(9):881-90.

Dos Santos AMP, Ferrari RG, Conte-Junior CA. Virulence Factors in *Salmonella Typhimurium*: The Sagacity of a Bacterium. Curr Mikrobiol. 2019 Jun;76(6):762-773.

Dosler S, Karaaslan E, Alev Gerceker A. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. 2016 Apr;28(2):95-103.

Doyle MP, Steenson LR., Meng J. Bacteria in food and beverage production. In: The Prokaryotes, Bacteriology and Biotechnology, 4th edn, Edited by E. Rosenberg. Springer-Verlag, New York 2013; 241-256p.

Duman Aydın B. Bazı tıbbi bitki ve baharatların gıda patojenleri üzerine antibakteriyel etkisinin araştırılması. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2008.14: 83-87.

Ekambaram SP, Perumal SS, Balakrishnan A, Marappan N, Gajendran SS, Viswanathan V. Antibacterial synergy between rosmarinic acid and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Intercult Ethnopharmacol. 2016 Sep 21;5(4):358-363.

Eminağaoğlu Ö., Bektaş T., Yumrutaş Ö., Aşkın Akbulut H., Daferera D., Polissiou M., Sökmen A. (2007). The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch) Boiss. and *Satureja cuneifolia* Ten. Food Chemistry 100:339-343.

Eraç B, Temel A. Bakteriyel Biyofilmler: Saptama Yöntemleri ve Antibiyotik Direncindeki Rolü. Türk Mikrobiyol Cem Dergi 2018;48(1):1-13.

Esaiassen E, Hjerde E, Cavanagh JP, Simonsen GS, Klingenberg C; Norwegian Study Group on Invasive Bifidobacterial Infections. Bifidobacterium Bacteremia: Clinical Characteristics and a Genomic Approach To Assess Pathogenicity. J Clin Microbiol. 2017 Jul;55(7):2234-2248.

Eswaranandam S, Hettiarachchy NS, Johnson MG. Antimicrobial Activity Of Citric, Lactic, Malic, Or Tartaric Acids And Nisin-Incorporated Soy Protein Film Against *Listeria Monocytogenes*, *Escherichia Coli* O157:H7, And *Salmonella Gaminara*. Vol. 69, Nr. 3, 2004—Journal Of Food Science.

Fadil M, Fikri-Benbrahim K, Rachiq S, Ihssane B, Lebrazi S, Chraïbi M, Haloui T, Farah A. Combined treatment of *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils against *Salmonella typhimurium*: Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology. Eur J Pharm Biopharm. 2018 May;126:211-220.

Fakılı O. Türkiye’de Kekik Adı İle Anılan Bitkiler Konusunda Yapılan Çalışmaların Envanteri. Çukurova Üniv. Fen Bil. Enst. Tarla Bitkileri. Adana. (2010).

Fanning et al, Fanning LJ, Hall M, Cronin et al. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. PNAS, 109 2012; 2108-2113.

Fedeli D, Berrettini M, Gabryelak T, Falcioni G. The effect of some tannins on trout erythrocytes exposed to oxidative stress. *Mutation Research* 2004;563, 89–96.

Fernandes-Naglik L, Downes J, Shirlaw P, Wilson R, Challacombe SJ, Kemp GK, Wade WG. The clinical and Mikrobiological effects of a novel acidified sodium chlorite mouthrinse on oral bacterial mucosal infections. *Oral Dis.* 2001 Sep;7(5):276-80.

Fijan S. Mikroorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014; 11, 4745-4767.

Flemming H. and Wingender J. The biofilm matrix., *Nature Reviews Mikrobiology*, 2010; 8, 9, 623–33.

Fliss I, Arthur C. Ouwehand, Ehab Kheadr, Sampo Lahtinen, and Stephen J. Davids *Bifidobacteria: genomiks and molecular aspects*. B. Mayo, D. van Sinderen (Eds.), *Antimicrobial Activity of the Genus Bifidobacterium*, Caister Akademik Press, Norfolk, .UK (2010). (Chapter 7).

Foster.T. Chapter *Staphylococcus* Books.(1996).

Francesca Stingle, John W. Newell, and Jean-Richard Neeser. "Unraveling the Function of Glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6." *J Bacteriol.* 1999 October; 181(20): 6354–6360.

Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the Crossroads of Food Safety. *Int. J. of Food Mikrobiol.*, 1999; 47: 1-24.

Frece J, Kos B, Svetec IK, Zgaga Z, Mrsa V, Susković J. Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Mikrobiol.* 2005;98(2):285-92.

Foteini KM. Biofilms in water industry: case study of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium – biofilm formation and control in vitro and in situ. MSc Thesis, Agricultural University of Athens, Athens, Greece. (2015).

Furtado MA, de Almeida LC, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss Mike evaluated by the Mikronucleus assay. Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ. 2008; 657, 150–154.

Furukawa S. Studies on formation, control and application of biofilm formed by food related Mikroorganisms. Biosci Biotechnol Biochem. 2015;79(7):1050-6.

Fuster i Valls N. Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. (2006).

Galié S, García-Gutiérrez C, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. Front Mikrobiol. 2018 May 7;9:898.

Ghaffarı E. Bazı patojen bakterilerin ekzopolisakkarit (eps) üretimi ile antibiyotik dirençliliklerinin incelenmesi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, 2013, (Danışman: Prof. Dr. Yavuz Beyatlı)

Giaouris E, Heir E, Desvaux M, Hébraud M, Møretrø T, Langsrud S, et al. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. 2015;6:841.

Giraffa G. Functionality of Enterococci in Dairy Products. International Journal of Food Mikrobiology, 2003; 88 (2-3):215-222

Golovlev EL. The Mechanism of Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Type of Structured Population. Mikrobiology, 2002;71 (3), pp: 249 254.

Gómez NC, Ramiro JMP, Quecan BXV, de Melo Franco, BDG. Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. *Frontiers in Mikrobiology*, 2016;7(863): 1-16.

González Ribas F. Desarrollo y aplicación de sensores para evaluar la contaminación Mikrobiológica de superficies domésticas españolas y de la efectividad de desinfectantes in situ de productos limpiadores comerciales.((2005).

Gökçen PÖ. *Rosmarinus Officinalis* L. Bitkisi Üzerinde Fitoterapötik Araştırmalar Yüksek Lisans Tezi, 2017, Ankara (Danışman: PROF. DR. BİLGE ŞENER).

Gulgor G, Korukluoglu M. Biofilms and Their Advantages/Disadvantages in Food Industry. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs* (A. Méndez-Vilas, Ed.) (2016).

Güçlü İ, Yüksel V. Fitoterapide antiviral bitkiler. *deneysel tıp dergisi | CİLT: 7 | SAYI: 13* | 2017.

Hall-Stoodley L, Costerton J, and Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nature Reviews Mikrobiology*, 2,95–108, 2004.

Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid- β aggregation pathway. *Am. J. Pathol*, 2009; 175. 2557–2565.

Han X, Zhang LJ, Wu HY, Wu YF, Zhao SN. Investigation of Mikroorganisms involved in kefir biofilm formation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018 Dec;111(12):2361-2370.

Hancock V, Dahl M, Vejborg RM, Klemm P. Dietary plant components ellagic acid and tannic acid inhibit *Escherichia coli* biofilm formation. J Med Mikrobiol. 2010 Apr;59(Pt 4):496-8.

Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. Salmonellae interplay with host cells. 2008; 6 53–66.

Harrigan WF, McCance ME. Laboratory methods in Mikrobiology. New York: Akademik Press; 1966, p: 8-65.

Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz J Infect Dis. 2011 Jul-Aug;15(4):305-11.

Hassan AN. ADSA foundation scholar award: possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods. Journal of Dairy Science, 2008; 91(4): 1282-1298.

Heijmen FH, Pant JS, Middelkoop E, Kreis RW. & Hoekstra MJ. Cross-linking of dermal sheep collagen with tannic acid, Biomaterials, 1997;18, 749–754.

Hendra R, Ahmad S, Sukari A, Shukor MY. and Oskoueian E. Flavonoid Analyses and Antimikrobial Activity of Various Parts of Phaleria Macrocarpa (Scheff.) Boerl Fruit. International Journal of Molecular Sciences, 2011; 12: 3422- 3431.

Heydari S, Eftekhari F. Biofilm Formation and β -Lactamase Production in Burn Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Jundishapur J Mikrobiol. 2015 Mar 21;8(3):e15514.

Heyman M, Ménard S. Probiotic Mikroorganisms: how they affect intestinal pathophysiology Cell Mol Life Sci. 2002 Jul;59(7):1151-65.

Hidalgo-Cantabrana, B. Sánchez, D. Moine, et al. Insights into the ropy phenotype of the exopolysaccharide-Producing strain *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* A1dOxR. *Appl. Environ. Mikrobiol.*, 79 (2013), pp. 3870-3874.

Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. *Mikrobiol Spectr.* 2017 Jun;5(3).

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 11, 506–514.

Houdt RV, Mikhels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Mikrobiology*, 2005;156, pp: 626 633.

Hsieh CY, Osaka T, Moriyama E, Date Y, Kikuchi J, Tsuneda S. Tsuneda. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiol Rep.* 2015 Mar;3(3):e12327.

Huang, S.S.; Zheng, R.L. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. *Cancer Lett.* 2006; 239. 271–280.

Hudson EA, Dinh PA, Kokubun T, Simmonds MS, Gescher A. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Can. Epidemiol. Biomark. Prev.* 2000; 9, 1163–1170.

Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Mikrobiology. On: Wed, 2018; 12:55:47.

Hyeon JW, Kim SY, Lee SM, Lee J, An SS, Lee MK, Lee YS. Anti-Prion Screening for Acridine, Dextran, and Tannic Acid using Real Time-Quaking Induced Conversion: A Comparison with PrPSc-Infected Cell Screening. PLoS One. 2017 Jan 17;12(1).

Ibarra JA, Steele-Mortimer O. Salmonella – the ultimate insider. Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. Cell Mikrobiol. 2009 Nov;11(11):1579-86.

Ibrahim S A. Lactic Acid Bacteria: Lactobacillus spp.: Other Species. (2016).

Inayatullah S, Shafee M, Shafiq M, Asif M, Kakar S, Khan YH, Amir M, Yakoob A, Baloch A. Antimicrobial activity of Thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil cultivated in Quetta, Balochistan, Pakistan. International Journal of Biosciences. (2017).

Inturri A, Stivala F, Sinatra R, Morrone G, Blandino G. Scanning electron Mikroskopy observation of adhesion properties of *Bifidobacterium longum* W11 and chromatographic analysis of its exopolysaccharide. Food Nutr. Sci., 5 2014; pp. 1787-1792.

Iwona R, Katarzyna S. Glycosylation of proteins of human skin fibroblasts is changed by rosmarinic acid. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2019 Oct 25.

Jafarei P, Tajabadi Ebrahimi M. *Lactobacillus acidophilus* cell structure and application. African Journal of Mikrobiology Research 2011; 4033-4042, 30

Jalilsood T, Baradaran A, Song AAL, Foo HL, Mustafa S, Saad WZ, Yusoff K, Rahim RA. Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria by a novel biofilm-forming *Lactobacillus* isolate: a potential host for the expression of heterologous proteins. Mikrobial Cell Factories, 2015;14(96): 1-14.

Jamal M, Tasneem U, Hussain T, Andleeb S. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. e-ISSN:2320-3528.(2015).

Jamroz D, Wiliczkievicz A, Wertlecki TJ, Orda J, Skoropinska J. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. Br. Poult. Sci. 2005;46: 485-493.

Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. Mikrobiol Spectr. 2018 Feb;6(1).

Johnson EJ, Zemanick ET, Accurso FJ, Wagner BD, Robertson CE, Harris JK. Molecular Identification of *Staphylococcus aureus* in Airway Samples from Children with Cystic Fibrosis. PLoS One. 2016 Jan 25;11(1):e0147643.

Kailasapathy, J. Chin Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp* Immunol. Cell Biol., 2000; 80-88.

Karaca B, Akkaya I, Çöleri Cihan A. *Lentinus edodes*, *Lactarius deliciosus* ve *Ganoderma lucidum*'ün antibiyofil ve antimikrobiyal etkinlikleri. Kastamonu Univ.,Orman Fakültesi Dergisi, 2017;17 (4): 660-668.

Karou D, Nadembega WMC, Ouattara L, Ilboudo DP, Canini A, Nikiema JB, Simpore J, Colizzi V, Traore AS. African Ethnopharmacology and New Drug Discovery. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotech. 1(1):x-y. (2007).

Karthikkumar V, Sivagami G, Vinothkumar R, Rajkumar D and Nalini N. Modulatory efficacy of rosmarinic acid on premalignant lesions and antioxidant status in 1, 2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. Environmental Toxicology and Pharmacology 34: 949–958. PLoS One, 10, 2015;1-14.

Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, Joloba ML, Najjuka FC. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Ann Clin Mikrobiol Antimikrob. 2010 Aug 13;9:23

Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad AA, Ali SM, Khan AU. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. Molecules, 2009; 14(2):586-97.

Kırbağ S, Kurşat M, Kırbağ Zengin F. Elazığ'da tıbbi amaçlı kullanılan bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri, Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları. (2005).

Kıvanç AK. Restoratif materyallerin yüzeylerinde *S. mutans*'ın biyofilm oluşturmaları ve probiyotik laktik asit bakterisinin biyofilm üzerine etkinliğinin in vitro olarak değerlendirilmesi. Doktora tezi, 2018. Eskişehir (Danışman: DOÇ. DR. HAKTAN YURDAGÜVEN).

Kızıloğlu R, Kızılaslan H, Eren HZ. Tıbbi ve Aromatik Amaçlı Kullanılan Bitkilerde Tüketici Davranışlarının İncelenmesi (Kahramanmaraş İli Örneği). 2017;34 (3), 27-35.

Kiliç I, Yeşiloğlu Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2013 Nov;115: 719-24.

Kim DA, Choi HS, Ryu ES, Ko J, Shin HS, Lee JM, Chung H, Jun E, Oh ES, Kang DH. Tannic acid attenuates the formation of cancer stem cells by inhibiting NF-κB-mediated phenotype transition of breast cancer cells. Am J Cancer Res. 2019 Aug 1;9(8):1664-1681.

Kim TJ, Silva JL, Jung YS. Antibacterial activity of fresh and processed red muscadine juice and the role of their polar compounds on *Escherichia coli* O157:H7. J Appl Mikrobiol. 2009 Aug;107(2):533-9.

Kim TJ, Silva JL, Jung YS, Kim MK. Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. Food Chemistry 118 2010; 740–746.

Kim TY, Cha SH, Cho S, Park Y. Tannic acid-mediated green synthesis of antibacterial silver Nanoparticles. Arch Pharm Res. 2016 Apr;39(4):465-473.

Kim DS, Kim HR, Woo ER, Hong ST, Chae HJ, Chae SW. Inhibitory effects of rosmarinic acid on adriamycin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells by inhibiting reactive oxygen species and the activations of c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase. Biochem. Pharm. 2005; 70, 1066–1078.

Kim WJ, Heo JS, Shin SB. & Ko, J.Y. Measurement of color difference in the leather dyeing process with natural dyes, Society of Leather Technologists and Chemists, 2003; 87, 25–29.

Kirk-Othmer. Encyclopedia of Chemical Technology, Third Edition, Vol. 13, WileyInterscience Publication, United States of America, ISBN 0-471-02066-4.

Kocabaş YZ. and Karaman S. —Essential oils of Lamiaceae family from South East Mediterranean Region (Turkey)¶, Pakistan Journal of Biological Sciences, 2001; 4(10):1221- 1223.

Koç S. Bazı geçiş metal katyonlarının kumarin/pkumarik asit içeren karışık ligandli komplekslerin sentezi, yapısal karakterizasyonu ve biyolojik aktifliklerinin incelenmesi. Hitit üniversitesi.Yüksek lisans tezi, 2014. Çorum (Danışman: DOÇ. DR. DURSUN ALİ KÖSE)

Koeth LM, DiFranco-Fisher JM, McCurdy S. A Reference Broth Mikrodilution Method for Dalbavancin In Vitro Susceptibility Testing of Bacteria that Grow Aerobically. J Vis Exp. 2015 Sep 9;(103):53028.

Kolaç T, Gürbüz P, Yetiş G.”DOĞAL ÜRÜNLERİN FENOLİK İÇERİĞİ VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ”İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi, Cilt 5, Sayı 1 2017; ,sf:36-37.

Kong CS, Jeong CH, Choi JS, Kim KJ, Jeong JW.Antiangiogenic effects of p-coumaric acid in human endothelial cells.Phytother Res. 2013 Mar;27(3):317-23.

Kostaki M , Chorianopoulos N, Braxou E, Nychas GJ, Giaouris E. Differential biofilm formation and chemikal disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. Applied and Environmental Mikrobiology, 2012;78(8): 2586–2595.

Kot B, Wicha J, Piechota M, Wolska K, Gruzewska A.Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, p-coumaric, and ferulic acids on uropathogenic *Escherichia coli*.Turk J Med Sci. 2015;45(4):919-24.

Kökümer T, Akbaş MY.”Malik Asit Uygulamalarının *S.aureus* Biyofilmleri Üzerinde Antibiyofilm Etkileri” KSÜ Doğa Bil. Derg., 2016;19(1):37-42.

Krishnan V, Chaurasia P, Kan A. Pili in Probiotic Bacteria.(2016).

Kubota H, Senda S, Nomura N, Tokuda H, Uchiyama H. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. J. Biosci. Bioeng. 2008;106:381–386.

Kumar CG, Anand SK. Significance of Mikrobial biofilms in food industry: a review. International Journal of Food Mikrobiology, 1998;42, pp: 9 27.

Labauve, A. E. & Wargo, M. J. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. Current Protocols in Mikrobiology, 2012; 1-8.

Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Velez, M.P., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. Applied and Environmental Mikrobiology, 2007; 73(21): 6768-6775.

Leccese Terraf MC, Juarez Tomas MS, Rault L, Le Loir Y, Even S, Nader-Macias ME. Biofilms of vaginal *Lactobacillus reuteri* CRL 1324 and *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1332: kinetics of formation and matrix characterization. Archives of Mikrobiology. Arch Microbiol. 2016 Sep;198(7):689-700.

Lee B, Heo J, Hong S, Kim EY, Sohn YJ, Jung HS. dl-Malic acid as a component of α -hydroxy acids: effect on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced inflammation in atopic dermatitis-like skin lesions in vitro and in vivo. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2019 Dec;41(6):614-621.

Lee MC, Hsu YJ, Chuang HL, Hsieh PS, Ho HH, Chen WL, Chiu YS, Huang CC. In Vivo Ergogenic Properties of the *Bifidobacterium longum* OLP-01 Isolated from a Weightlifting Gold Medalist. Nutrients. 2019 Aug 24;11(9).

Lee J, Jung E, Koh J, Kim YS, Park D. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. J. Dermatol. J Dermatol. 2008 Dec;35(12):768-71.

Li GS, Jiang WL, Tian JW, Qu GW, Zhu HB, Fu FH. In vitro and in vivo antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. Phytomedicine 2010; 17. 282–288.

Linares DM, Gómez C, Renes E, Fresno JM, Tornadijo ME, Ross RP, Stanton C. Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. Front. Mikrobiol. 2017; 8, 846.

López et al., P. López, D.C. Monteserín, M. Gueimonde, et al. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains elicit different in vitro responses upon interaction with human cells. Food Res. Int., 46. 2012; pp. 99-107.

Lou Z, Tang Y, Song X, Wang H. Metabolomics-Based Screening of Biofilm-Inhibitory Compounds against *Pseudomonas aeruginosa* from Burdock Leaf ,Molecules. 2015 Sep 8;20(9):16266-77.

Luckow T, Delahunty C. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. Food Qual Prefer., 2004;15: 751–759.

Luis Balcazar J, Decamp O, Vendrell D, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I. Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. Mikrobial Ecology in Health and Disease. 2006; 18: 65 -70

Lundberg U, Senn BM, Schüler W, Meinke A, Hanner M. Identification and characterization of antigens as vaccine candidates against *Klebsiella pneumoniae*. Hum Vaccin Immunother. 2013 Mar;9(3):497-505.

Maegaard K, Garcia-Robledo E, Kofoed MVW, Agneessens LM, de Jonge N, Nielsen JL, Ottosen LDM, Nielsen LP, Revsbech NP. Biogas upgrading with hydrogenotrophic methanogenic biofilms. Bioresour Technol. 2019 Sep;287:121422.

Makvana.S.MD,L.R.MD. *Escherichia coli* Infections. Pediatrics in Review 2015;36(4):167-71.

Malatyali E, Tepe B, Degerli S, Berk S, In vitro amoebicidal activities of *Satureja cuneifolia* and *Melissa officinalis* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites 2012; 110:2175– 2180.

Mann A. Evaluation of antimicrobial activity of *Anogeissus leiocarpus* and *Terminalia avicennioides* against infectious diseases prevalent in hospital environments in Nigeria. J. Mikrobiol. Res., 2012;2(1):6- 10.

Marasini BP, Baral P, Aryal P. Evaluation of antibacterial activity of some traditionally used medicinal plants against human pathogenic bacteria. Bio. Med. Res. Int., 2015; 1-6.

Markowiak P, Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. Nutrients. 2017 Sep;15;9(9).

Matejčková Z, Liptáková D, Spodniaková S, Valík L. Characterization of the growth of *Lactobacillus plantarum* in milk in dependence on temperature. Acta Chimica Slovaca, Vol. 9, No. 2, 2016; pp. 104—108.

Merritt JH, Kadouri DE. ve O'Toole, G.A. Growing and Analyzing Static Biofilms. Curr Protoc Mikrobiol. Curr Protoc Microbiol. 2005 Jul;Chapter 1:Unit 1B.1.

Mielko KA, Jabłoński SJ, Milczewska J, Sands D, Łukaszewicz M, Młynarz P. Metabolomik studies of *Pseudomonas aeruginosa*. World J Mikrobiol Biotechnol. 2019 Nov 7;35(11):178.

Mikelsaar M, Zilmer M. *Lactobacillus fermentum* ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic Mikrob Ecol Health Dis. 2009 Apr;21(1):1-27.

Mirjana S, Nada B, Valerija D. Variability of *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils and their antimicrobial activity depending on the stage of development. Eur Food Res Technol 2004; 218:367–371.

Mitsuoka T. Journal of Industrial Mikrobiology 1990; 6: 263.

Mitsuoka T. Bifidobacteria and their role in human health. Journal of Industrial Mikrobiology, 1990; 263-268.

Momtaz S, Abdollahi M. An Update on Pharmacology of Satureja Species; From Antioxidant, Antimicrobial, Antidiabetes and Anti-hyperlipidemic to Reproductive Stimulation. International Journal of Pharmacology 2010;6,(4), 346- 353

Moradi P, Mahdavi A, Khoshkam M, Iriti M. Lipidomics Unravels the Role of Leaf Lipids in Thyme Plant Response to Drought Stress. Published: 28 September 2017.

MORRISON A.J. & WENZEL RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Reviews of Infectious Diseases, 1984; 6, S627-S642.

Mostefaoui A, Hakem A, Yabrir B, Boutaiba S, Badis A. Screening for exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian raw camel milk. African Journal of Mikrobiology Research, 2014; 8(22): 2208-2214.

Moura CM., Napoleão TH, Paiva Patrícia MG, Luana CBB. Coelho. Bacterial Biofilms: The Structure, Development and Potential of Plant Compounds for Alternative Control. (2017).

Nalbantbaş Z, Gölcü A. Kahramanmaraş yöresine ait şifalı bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri. KSU. J. Nat. Sci., 2009;12:1-8.

Neves JA, Neves JA, Oliveira RCM. Pharmacological and biotechnological advances with *Rosmarinus officinalis* L. Expert Opin Ther Pat 2018; 28(5): 399-413.

Ninan N, Forget A, Shastri VP, Voelcker NH, Blencowe A. Antibacterial and Anti-Inflammatory pH-Responsive Tannic Acid-Carboxylated Agarose Composite Hydrogels for Wound Healing. ACS Appl Mater Interfaces. 2016 Oct 26;8(42):28511-28521

Nunes R, Pasko P, Tyszka-Czochara M, Szewczyk A, Szlosarczyk M, Carvalho IS. Antibacterial, antioxidant and anti-proliferative properties and zinc content of five south Portugal herbs. Pharm Biol. 2017 Dec;55(1):114-123.

Olgun M, Başçiftçi Z, Ayter N, Turan M, Aydın D, Şaban Z, Sönmez AC ,Koyuncu O.”Potasyum İyodür Uygulamasının Ekmeklik Buğday Çeşitlerinin Biyokimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi”Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 11 (2):46-60, 2016.

Orlowski P, Tomaszewska E, Gniadek M, Baska P, Nowakowska J, Sokolowska J, Nowak Z, Donten M, Celichowski G, Grobelny J, Krzyzowska M.”Tannic acid modified silver nanoparticles show antiviral activity in herpes simplex virus type 2 infection”. PLoS One. 2014 Aug 12;9(8):e104113

Osakabe N, Takano H, Sanbongi C, Yasuda A, Yanagisawa R, Inoue K, Yoshikawa T. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. Biol. Factors 2004; 21. 127–131.

Ouwehand AC, Forssten S, Hibberd AA, Lyra A, Stahl B. Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. Ann Med. 2016;48(4):246-55.

Öke F, Aslim B, Öztürk S, Altundag S. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. 2009; 112(4),874-879.

Özcelik B, Orhan I, Toker G. Antiviral and antimicrobial assessment of some selected flavonoids. Z. Naturforsch. [C.], 2006; 61, 632-638.

Özkan G. —Türkiye’de Lamiaceae (Labiatae) familyasına ait baharat veya çeşni olarak kullanılan bazı bitkilerin fenolik bileşenleri ile antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 4 s.,(2007).

Özteber M. Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Belirlenmesi. (2013).

Palmer, Chana, et al. "Development of the human infant intestinal Mikrobiota." PLoS biology 5.7 2007; e177.

,

Patel AR. Probiotic fruit and vegetable juices- recent advances and future perspective. Int Food Res J., 2017; 24(5): 1850-1857.

Payne DE, Martin NR, Parzych KR, Rickard AH, Underwood A, Boles BR. Tannic acid inhibits *Staphylococcus aureus* surface colonization in an IsaA-dependent manner. Infect Immun. 2013 Feb;81(2):496-504.

Peabody CR, Chung YJ, Yen MR, Vidal-Ingigliardi D, Pugsley AP, Saier MH. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. Mikrobiology-Sgm, 2003; 149, 3051- 3072.

Pei K, Ou J, Huang J, Ou S. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities J Sci Food Agric. 2016 Jul;96(9):2952-62.

Phillips PL, Yang Q, Davis S, Sampson EM, Azeke JI, Hamad A, Schultz GS. Antimicrobial dressing efficacy against mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on porcine skin explants. Int Wound J. 2015 Aug; 12(4):469-83.

Piera Serra G. Estudio de biofilms: Formación y consecuencia. (2003).

Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouvelekis LS, Daikos GL. *Klebsiella pneumoniae* Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. Pediatr Infect Dis J. 2017 Oct;36(10):1002-1005.

Piqué N, Berlanga M, Miñana-Galbis D. Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics: An Overview. *Int J Mol Sci*. 2019 May 23;20(10).

Polat R. Havran ve Burhaniye Çevresinde Tarımsal Biyoçeşitlilik ve Etnobotanik Araştırmalar. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Doktora tezi, basılmamış 2010).

Popović N, Dinić M, Tolinački M, Mihajlović S, Terzić-Vidojević A, Bojić S, Djokić J, Golić N, Veljović K. New Insight into Biofilm Formation Ability, the Presence of Virulence Genes and Probiotic Potential of *Enterococcus* sp. Dairy Isolates *Front Mikrobiol*. 2018 Jan 30;9:78.

Prabhurajeshwar C, Chandrakanth RK. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomed J*. 2017 Oct;40(5):270-283.

Pradhan RN, Madhup SK, Pant SP. Antibiofilm and Biofilm Formation Among Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Pradhan et al*. 2019; *TUJM* 6(1): 63-69.

Pragasam SJ, Venkatesan V, Rasool M. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation*. 2013 Feb;36(1):169-76.

Quigley EMM. Bifidobacteria as Probiotic Organisms: An Introduction. (2017).

Qureshi N, Annous BA, Ezeji TC, Karcher P, Maddox IS. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Mikrob Cell Fact*. 2005 Aug 25;4:24.

Raba DA, Rosas-Lemus M, Menzer WM, Li C, Fang X, Liang P, Tuz K, Minh DDL, Juárez O. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* NQR Complex, a Bacterial

Proton Pump with Roles in Autopoisoning Resistance J Biol Chem. 2018 Oct 5;293(40):15664-15677.

Rama Devi K, Srinivasan R, Kannappan A, Santhakumari S, Bhuvaneswari M, Rajasekar P, Prabhu NM and Veera Ravi A. In vitro and in vivo efficacy of rosmarinic acid on quorum sensing mediated biofilm formation and virulence factor production in *Aeromonas hydrophila*. Biofouling 2016; 32: 1171–1183.

Ramraj SK, Arul V. Health Benefits of Human Probiotic *Lactobacillus plantarum*. Nutraceuticals and Functional Foods in Human Health and Disease Prevention, Chapter: 35, Publisher: CRC Press, Editors: Debasis Bagchi, Harry G. Preuss, and Anand Swaroop, 2016; pp.629-642.

Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. Biomed Res Int. 2015;2015:759348.

Rastall R., Gibson GR, Gill HS, Guarner F, Klaenhammer TR, Pot B, Reid G, Rowland IR. and Sanders ME. Modulation of the Mikrobial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. FEMS Mikrobiology Ecology, 2005; 52; 145-152.

Raybaudi-Massilia RM, Mosqueda-Melgar J, Martín-Belloso O, Antimikrobial Activity of Malic Acid Against *Listeria Monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 in Apple, Pear and Melon Juices. Food Control, 2009; 20 (2), 105-112

Ren B, Wang H, Wang S, Li H, Weir MD, Zhou X, Oates TW, Cheng L, Xu HHK. Do quaternary ammonium monomers induce drug resistance in cariogenic, endodontic and periodontal bacterial species?. Dent Mater. 2017 Oct;33(10):1127-1138.

Reverón I, Rodríguez H, Campos G, Curiel JA, Ascaso C, Carrascosa AV, Prieto A, de Las Rivas B, Muñoz R, de Felipe FL. Tannic acid-dependent modulation of selected *Lactobacillus plantarum* traits linked to gastrointestinal survival. PLoS One. 2013 Jun 11;8(6):e66473.

Risal G, Shrestha A, Kunwar S, Paudel G, Dhital R, Budha M, Nepal R. Detection of biofilm formation by *Escherichia coli* with its antibiogram profile. Risal G et al. Int J Community Med Public Health. 2018 Sep;5(9):3771-3775.

Rocha AJ, Barsottini MR.D.O, Rocha RR, Laurindo MV, Moraes FL.L, Rocha SL. *Pseudomonas Aeruginosa*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes. 2019; Vol.62: e19180503.

Rogers HJ. The rate of formation of hyaluronidase, coagulase, and total extracellular protein by strains of *Staphylococcus aureus*. Journal of general Mikrobiology, 1954. 10: p. 209-220.

Romo-Vaquero M, Selma MV, Larrosa M, et al. A rosemary extract rich in carnosic acid selectively modulates caecum Mikrobiota and inhibits β -glucosidase activity, altering fiber and short chain fatty acids fecal excretion in lean and obese female rats. PLoS One 2014; 9(4): e94687.

Ruas-Madiedo P, Moreno JA, Salazar N, Delgado S, Mayo B, Margolles A, et al. Screening of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal Mikrobiota. Applied and environmental Mikrobiology. 2007;73(13):4385-8

Ryu J H, Beuchat LR. Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. Applied and Environmental Mikrobiology 2005;7, pp: 247 254.

Sadekuzzaman M., Yang S., Mizan M. F. R., and Ha S. D., Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2015; 14, 4, 491–509.

Saggioro A. Leaky gut Mikrobiota, and cancer: an incoming hypothesis. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2014; pp. S62-S66.

Sağdıç O, Küçüköner E, Özçelik S. Probiyotik ve Prebiyotiklerin Fonksiyonel Özellikleri. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 2004; 35 (3-4), 221-228,

Sahiner N, Sagbas S, Sahiner M, Silan C, Aktas N, Turk M.”Biocompatible and biodegradable poly (Tannic Acid) hydrogel with antimicrobial and antioxidant properties. *Int J Biol Macromol.* 2016 Jan ;82:150-9.

Salas-Jara, M.J., Ilabaca, A., Vega, M., García, A. Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. *Mikroorganisms*, 2016; 4(35): 1-14.

Sánchez et al., 2014. B. Sánchez, I. González-Rodríguez, C.G. de los Reyes Gavilán, P. Ruas-Madiedo, A. Margolles. Interactive probiotics E. Pessione (Ed.), *Bifidobacteria and Their Interaction with the Gastrointestinal Environment*, CRC Press, New York (2014).(Chapter 5).

Santos ALSD, Galdino ACM, Mello TP, Ramos LS, Branquinha MH, Bolognese AM, Columbano Neto J, Roudbary M. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018 Jul 26;113(9):e180212.

Sarkar A, Mandal S. Bifidobacteria—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. *Mikrobiological Research* Volume 192, November 2016; Pages 159-171.

Satıl F, Kaya A. Leaf Anatomy And Hairs Of Turkish *Satureja L.* (Lamiaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 2007; 49/1: 67–76.

Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM. Review Probiotic and other functional Mikrobes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol.* 2005 Apr; 16(2):204-11.

Schelin J, Susilo Y B, Johler S. Expression of Staphylococcal enterotoxins under stress encountered during food production and preservation. 2017; 9:E401.

Schell MA. et al. "The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adoption to the human gastrointestinal tract". *Proc Natl Acad Sci USA*. Published online October 2002; 15.

Sengupta R, Altermann E, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Roy NC. The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Mikrobe Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Mediators Inflamm.* 2013; 237921.

Serafini, F. Strati, P. Ruas-Madiedo. Evaluation of adhesion properties and antibacterial activities of the infant gut commensal *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. *Anaerobe*, 21 2013; pp. 9-17.

Saran S, Isar J. & Saxena, R.K. A modified method for the detection of Mikrobial proteases on agar plates using tannic acid, *Journal of Biochemikal and Biophysical Methods*, 2007;70, 697–699.

Shamsuzzoha M, Hassanujjaman M, Islam MA, Chowdhury AKMMB, Alam MA, Islam MS. Antimikrobial Studies of Mixed Ligand Transition Metal Complexes of Cu and Cd (II) with Maleic Acid and Heterocyclic Bases. *Universal Journal of Applied Science*, 2015; 3 (3), 31-34.

Shanlou Q, Weihua L, Ryoko T, Miyako H, Keiko M, Fumio T, Yukio N, Masataka Y. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. Free Radic. Res. 2005; 39. 995–1003.

Sharifi-Rad J, Sharifi-Rad M, Hoseini-Alfatemi SM, Iriti M, Sharifi-Rad M, Sharifi-Rad M. Composition, Cytotoxic and Antimicrobial Activities of *Satureja intermedia* C.A.Mey Essential Oil. Int. J. Mol. Sci. 2015; 16, 17812-17825.

Sharmal R, Bhaskar B, Sanodiya1 BS, Thakur GS, Jaiswal1 P, Yadav N, Sharma A, Bisen PS. Probiotic Efficacy and Potential of *Streptococcus thermophilus* modulating human health: A synoptic review. Volume 9, Issue 3 Ver. II (May -Jun. 2014), PP 52-58.

Shetty K, Lin Y. Phenolic Antimicrobials from Plants for Control of Bacterial Pathogens. Taylor and Francis Group, LLC. (2007)

Shori AB. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. Food Biosci., 2006;13: 1–8

Siamansouri M, Mozaffari S, Alikhani F. Bacteriocins and lactic acid bacteria. CNB Scholar Journals, 2013, 2;5: 227-234.

Silagyi KS. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. (2007).

Singla R., Goel H, Ganguli A. Novel synergistic approach to exploit the bactericidal efficacy of commercial disinfectants on the biofilms of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. Journal of Bioscience Bioengineering, 2014;118(1):34-40.

Skocibusic M., Bezic N. and Dunkic V. Variability of *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils and their antimicrobial activity depending on the stage of development, European Food Research and Technology, 2004; 218 (4) :367-371.

Slany M, Oppelt J, Cincaro L. Formation of *Staphylococcus aureus* Biofilm in the Presence of Sublethal Concentrations of Disinfectants Studied via a Transcriptomik Analysis Using Transcriptome Sequencing (RNA-seq). Appl Environ Mikrobiol. 2017 Dec 15; 83(24).

Slobodníková L, Fialová S, Hupková H, Grancai D. Rosmarinic acid interaction with planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus*. Nat Prod Commun. 2013 Dec;8(12):1747-50.

Sousa WR., Rocha C, Cardoso CL, Silva DHS, Zandoni MVB. Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. Journal of Food Composition and Analysis, 2004;17, 619-633.

Stanbro j, Bond M, Moore J, Stockelman M.G, Watters C. The Probiotic Biofilm: Lactobacillus and Bifidobacterium Survival Tactics. 2016;138-6.

Stratford M. And Eklund T. Organic Acids And Esters. In Food Preservatives, 2nd Ed. (N.J. Russell And G.W. Gould, Eds.) Pp. 48–84kluwer Akademik/Plenum Publishers, New York, Ny. 2003.

Sui X, Liu T, Ma C, Yang L, Zu Y, Zhang L, Wang H. Mikrowave irradiation to pretreat rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) for maintaining antioxidant content during storage and to extract essential oil simultaneously. Food Chem. 2012; 131. 1399–1405.

Sultana AJ, McBain CA. O'Neill. Strain-dependent augmentation of tight-junction barrier function in human primary epidermal keratinocytes by Lactobacillus and Bifidobacterium lysates Appl. Environ. Mikrobiol., 2013; pp. 4887-4894.

Sun S, Liu J, Zhang M, He S. Simultaneous improving nitrogen removal and decreasing greenhouse gas emission with biofilm carriers addition in ecological floating bed. Bioresour Technol. 2019 Nov;292:121944.

Sun Z, He X, Brancaccio VF, Yuan J, Riedel CU. Bifidobacteria exhibit LuxS-dependent autoinducer 2 activity and biofilm formation. PLoS One. 2014 Feb 5;9(2):e88260.

Sungur Ş. & Uzar A. Investigation of complexes tannic acid and myricetin with Fe(III). Spectrochimika Acta Part A, 2008; 69, 225–229.

Şekeroğlu N, Deveci M, Buruk K, Gürbüz B, Ipek A. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2007; 87, 1424–1426.

Tahmourespour A, Kermanshahi RK. The effect of a probiotic strain (*Lactobacillus acidophilus*) on the plaque formation of oral Streptococci. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 2011; 11(1): 37-40

Taşkın T, Çam ME, Taşkın D, Rayaman E. In vitro and In vivo biological activities and phenolic characterization of *Thymus praecox subsp. skorpilii var. skorpilii* - Journal of Food Measurement , 2018

Teixeira LD, Kling DN, Lorca GL, Gonzalez CF. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 diminishes caspase-1 maturation in the gastrointestinal system of diabetes prone rats. Benef Mikrob. 2018 Apr 25;9(3):527-539.

Temel A, Bayrı E. Bakteriyel Biyofilmler: Saptama Yöntemleri ve Antibiyotik Direncindeki Rolü. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi , 2018; 48(1):1-13.

Tepe B, Sökmen M, Akpulat HA, Daferara D, Polissiou M, Sökmen A. *Thymus praecox subsp. skorpilii var. skorpilii*' nin Uçucu Yağ Asitlerinin Tayini ve Antioksidant Aktivitelerinin Araştırılması. Journal of Food Engineering 2005; 66(4), 447-454.

Tepe B, Cilkiz MA. Pharmacological and phytochemical overview on *Satureja*. Pharmaceutical Biology, 2016; 54:3, 375-412.

Terraf MC, Juárez Tomás MS, Nader-Macías ME, Silva C. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. J Appl Mikrobiol. 2012 Dec; 113(6):1517-29.

Todhanakasem T. Mikrobial biofilm in the industry. African journal of Mikrobiology research 2013; 7(17):1625-1634.

Topal M, Şenel GÜ, Topal EIA, Öbek E. Antibiyotikler ve kullanım alanları. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2015; 31(3):121-127.

Tunalı Y. Farmasötik mikrobiyoloji uygulamaları. Star Ajans Ltd. Şti. 2.Baskı, (2014).

Turroni F, Duranti S, Milani C, Lugli GA, van Sinderen D, Ventura M. *Bifidobacterium bifidum*: A Key Member of the Early Human Gut Mikrobiota. Mikroorganisms. 2019 Nov 9;7(11). pii: E544.

Turroni F, Serafini F, Foroni E, Duranti S, O'Connell Motherway M, Taverniti V, et al. Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(27):11151-6.

Tutar U. Investigation of Antibacterial and Anti-biofilm Activity of *Thymbra spicata* Essential Oil on Multidrug- Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains. Cumhuriyet Sci. J., 2018; 650-657.

Tümen G, Satıl F, Dirmenci F, Öztekin F. Ticareti yapılan *Satureja L.* türlerinin doğadaki durumu. Balıkesir.(2003).

Tütüncü E.Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonlarında Kombinasyon.XIX. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 29 Mart 2018.

Tzima K, Brunton NP, Rai DK. Qualitative and Quantitative Analysis of Polyphenols in Lamiaceae Plants-A Review. Plants (Basel). 2018;7(25):1-30.

Uchida H, Fujitani K, Kawai Y, Kitazawa H, Horii A, Shiiba K, Saito K. And Saito, T. A new assay using surface plasmon resonance (SPR) to determine binding of the *Lactobacillus acidophilus* group to human colonic mucin. Biosci Biotechnol Biochem 2004; 68, 1–7.

Uçman A. *Thymus praecox subsp. scorpiu var. scorpiu*. Bitkisinin Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi. Farmakognozi Anabilim Dalı.(MEZUNİYET PROJESİ, Yard. Doç. Dr. Turgut TAŞKIN).

Uriota O, Denisa S, Junjuab M, Rousselb Y, Mourotb AD, Diot SB. *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate?. O. Uriot et al. / Journal of Functional Foods 2017;74–89.

Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Hacettepe Tıp Fakültesi. (1999).

Uysal NE. *Taraxacum farinosum* hausskn. et bornm. ve *taraxacum mirabile* wagenitz ekstraktlarının antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi (2011).

Valík L, Medved'ová A , Liptáková D. Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures. Vol. 47, 2008; No. 2, pp. 60-67.

Ventura, F. Turrone, D. van Sinderen. Diet-Mikrobe interactions in the gut: effects on human health and disease. K. Tuohy, D.D. Rio (Eds.), Bifidobacteria of the Human Gut: Our Special Friends, Akademik Press, Elsevier, USA (2014). (Chapter 4).

Veras KS, Fachel FNS, Pittol V, Garcia KR, Bassani VL, Dos Santos V, Henriques AT, Teixeira HF, Koester LS. Compatibility study of rosmarinic acid with excipients used in pharmaceutical solid dosage forms using thermal and non-thermal techniques. Saudi Pharm J. 2019 Dec;27(8):1138-1145.

Vergara A, Normanno G, Di Ciccio P, Pedonese F, Nuvoloni R, Parisi A, Santagada G, Colagiorgi A, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. Biofilm Formation and Its

Relationship with the Molecular Characteristics of Food-Related Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Food Sci. 2017 Oct; 82(10):2364-2370.

Visvalingam J, Zhang P, Ells TC, Yang X. Dynamics of Biofilm Formation by *Salmonella Typhimurium* and Beef Processing Plant Bacteria in Mono- and Dual-Species Cultures Mikrob Ecol. 2019 Aug;78(2):375-387.

Wang C, Zhou H, Niu H, Ma X, Yuan Y, Hong H, Liu C. Biomater Sci. Tannic acid-loaded mesoporous silica for rapid hemostasis and antibacterial activity. 2018 Nov 20;6(12):3318-3331.

Wickramasinghe, A.R. Pacheco, D.G. Lemay, D.A. Mills. Bifidobacteria grown on human milk oligosaccharides downregulate the expression of inflammation-related genes in Caco-2 cells. BMC Mikrobiol., 15, 2015; pp. 172-184.

Wilks SA, Mikhels H, Keevil CW. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces International. Journal of Food Microbiology 105, 2005; pp: 445-454.

Wu M C, Lin T L, Hsieh P F, Yang H C, Wang J T. Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. PLoS ONE 6:e23500. (2011).

Yalçın.N.A.Dirençli Bakteri İnfeksiyonları ve Maliyetleri.Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hast. ve Klinik Mikrobiyoloji AD 31.Mart.(2018)-KLİMİK-Antalya.

Yaylı B, Tosun G, Karakşe M, Renda G, Yaylı N .SPME/GC-MS Analysis of Volatile Organic Compounds from three Lamiaceae Species (*Nepeta conferta* Hedge & Lamond, *Origanum onites* L. and *Satureja cuneifolia* Ten.) Growing in Turkey. Asian Journal of Chemistry 2014; Vol. 26, (9): 2541-2544.

Yıldız CH. Carvacrol, tymol ve rosmarinic asit içeren bitki ekstraktlarının etlik piliçlerde performans, sindirim kanalı histomorfolojisi ve kan parametreleri üzerine etkileri. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, 2007, Edirne (Danışman: PROF.DR. NİZAMETTİN ŞENKÖYLÜ)

Yoğunlu A. Tunceli ekonomik değeri olan bitkiler raporu. Fırat Kalkınma Ajansı, Sektörel Araştırmalar Serisi, 2011;(5): 1-45.

Yun B, Oh S, Griffiths MW. *Lactobacillus acidophilus* modulates the virulence of *Clostridium difficile*. Journal of Dairy Science, 2014;97: 4745–4758.

Yücel E, Güney F, Şengün İY. The wild plants consumed as a food in Mihalıççık district (Eskişehir/Turkey) and consumption forms of these plants. Biological Diversity and Conservation. 3/3 2010; 158-175.

Zang LY, Cosma G, Gardner H, Shi X, Castranova V, Vallyathan V. Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. American Journal of Physiology. Cell Physiol. 2000; 279, 954–960.

Zhao Y, Chen M, Zhao Z, Yu S. The antibiotic activity and mechanisms of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse extract against food-borne pathogens. Food Chem. 2015 Oct 15;185:112-8.

Zhong H, Wang H, Tian Y, Liu X, Yang Y, Zhu L, Yan S, Liu G. Treatment of polluted surface water with nylon silk carrier-aerated biofilm reactor (CABR). Bioresour Technol. 2019 Oct;289:121617.

Zoral S, İnsan kaynaklı *Lactobacillus* spp. suşlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2013, Kırşehir (Danışman: DOÇ. DR. ERGİN KARİPTAŞ).

9.EKLER

EK-1



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Etik Kurulu

PROJENİN ADI : Bazı Bitki Ekstreleri ile Saf Fenolik Bileşiklerin Probiyotik ve Patojen Mikroorganizmaların Biyofilm Gelişimi Üzerine Etkisi
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Dr. Öğr. Üyesi Pervin RAYAMAN
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR: Elif KARPUZ
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 18.02.2019-52

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Pervin RAYAMAN

52 protokol nolu “Bazı Bitki Ekstreleri ile Saf Fenolik Bileşiklerin Probiyotik ve Patojen Mikroorganizmaların Biyofilm Gelişimi Üzerine Etkisi” isimli projeniz Enstitümüz Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.


Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Komisyon Başkanı


Doç.Dr. İlksen DEMİRBÜKEN


Prof.Dr. Hatice AŞÇI


Prof.Dr. Nerise BAHÇECİK

Doç.Dr. M. Ümit UĞURLU

Av. Funda IŞIK

Prof. Dr. Dilşad SAVE

Prof.Dr.Tuğba TUNALI AKBAY 

Prof.Dr. Hatice ARIKAN 

Doç.Dr. Betül OKUYAN

Av. Öncel Onur AKBAŞ

 **EFQM**
2011
Mükemmeliyet Yedinci

 **EUA**
European University Association

 **IPV**

 **MARMARA**

Marmara Üniversitesi Göztepe
Kampusu Sağlık Bilimleri
Enstitüsü 34688 Kadıköy /
İSTANBUL

0 (216) 414 44 23/12 (Faks)
0 (216) 414 44 23

Ayrıntılı bilgi için:
Süleyman
TÜRKMEÑOĞLU

saglik.ogrenci@marmara.edu.tr
<http://saglik.marmara.edu.tr>

EK-2 POSTER

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifika ları/Ödü lleri/Diğ er Ulusal Bildiriler

Elif KARPUZ, Pervin RAYAMAN, Erkan RAYAMAN, Turgut TAŞKIN. Bazı Bitki Ekstreleri ile Saf Fenolik Bileşiklerin Probiyotik ve Patojen Mikroorganizmalar Üzerine Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması (Poster sunumu, Page-197-198), Gevher Nesibe 4.Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi, 23-24 Kasım 2019/Ankara..



10 .ÖZGEÇMİŞ

Adı	Elif	Soyadı	Karpuz
Doğum Yeri	Üsküdar	Doğum Tarihi	02/03/1993
Uyruğu	T.C.	Tel	
E-mail	elifkarpuz3@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Marmara Üniversitesi	2016

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1		

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Ms Office (Word, Excel, PowerPoint)	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.